

REINIGUNG UND STRUKTURVERGLEICH VON ISOENZYMEN
DER FRUCTOSE-BISPHOSPHAT ALDOLASE AUS PFLANZEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereiches Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
INGO KRÜGER
aus Kiel

1984



Reinigung und Strukturvergleich von Isoenzymen
der Fructose-bisphosphat Aldolase aus Pflanzen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ingo Krüger

aus Kiel

1. Referent: Prof. Dr. C. Schnarrenberger

2. Referent: Prof. Dr. G. Lysek

Tag der mündlichen Prüfung: 12.3.84

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	8
2.1	Material	8
2.2	Reinigung der Aldolasen aus Spinat.....	8
2.2.1	Herstellung eines Rohhomogenats	8
2.2.2	Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose	9
2.2.3	Affinitätschromatographie an Cellulosephosphat	9
2.2.4	Ultrazentrifugation in Saccharosegradienten ...	10
2.2.5	Reinigung der Aldolase aus anderen Pflanzen ...	11
2.3	Isolierung von Chloroplastenproteinen	12
2.4	Enzymteste, Chlorophyll- und Proteinbestimmung	13
2.5	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	17
2.6	Bestimmung der relativen Molekülmassen	18
2.7	Aminosäureanalyse und Peptidkartierung	19
2.8	Herstellung von Antikörpern	20
2.9	Ouchterlony-Doppeldiffusionstest	21
2.10	Immuntitrationstest zur quantitativen Bestimmung der Antigen-Antikörper-Reaktion	22
2.11	Aldolaseaktivität in verschiedenen Entwicklungs- stadien bei Spinat	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Auftrennung von Aldolase-Isoenzymen aus Spinat- blättern an DEAE-Cellulose	24
3.2	Intrazelluläre Verteilung der beiden Aldolase- Isoenzyme aus Spinatblättern	24

3.3	Reinigung der Isoenzyme der Aldolase aus Spinatblättern	26
3.4	Bestimmung der relativen Molekülmassen der Aldolasen aus Spinatblättern	30
3.5	Reinigung der Aldolasen aus anderen Pflanzen ..	32
3.6	Eigenschaften der Aldolasen	35
3.7	Vergleich der Aldolasen mit immunchemischen Methoden	39
3.8	Peptidkartierung der Aldolasen aus Spinat	51
3.9	Die Expression der cytosolischen und Chloroplastenaldolase in jungen Spinatpflanzen	54
4	Diskussion	65
5	Zusammenfassung	90
6	Literaturverzeichnis	92

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cdNA	complementäre DNA
DEAE	Diethylaminoethyl
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent antibody technique
F _c	crystalline fragment of antibodies
mRNA	messenger RNA
mS	Millisiemens
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
O.D.	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
SDS	sodium dodecylsulfate
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	unit, Einheit der Enzymaktivität (1 unit ist die Bildung oder Umsetzung von 1 µmol des Produktes bzw. des Substrates pro Minute)
UDP	Uridindiphosphat
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight

1. Einleitung

Pflanzliche Zellen sind wie alle eukaryontischen Zellen durch interne Membransysteme in mehrere, gegeneinander abgegrenzte Zellkompartimente gegliedert, z.B. Kerne, Plastiden, Mitochondrien, Microbodies, endoplasmatisches Reticulum, Cytosol usw. Ein Austausch von Molekülen zwischen diesen Kompartimenten findet im allgemeinen nur in begrenztem Umfang statt. Jedoch ist die volle Funktionsfähigkeit einer Zelle nur bei hinreichend koordiniertem Zusammenwirken aller Zellkompartimente gewährleistet.

Während in vielen Fällen bestimmte physiologische Leistungen einer Zelle (oder Teilsequenzen solcher Leistungen) nur durch ein einziges Zellkompartiment erbracht werden (z.B. der Abbau von Acetyl-Coenzym A in den Mitochondrien), haben sich in den vergangenen Jahren Befunde akkumuliert, nach denen bestimmte physiologische Leistungen nicht nur in einem, sondern in zwei oder sogar mehreren Zellbereichen erbracht werden können. Sehr eindrucksvoll mag dies an der intrazellulären Verteilung der Malat Dehydrogenase und Aspartat Aminotransferase in pflanzlichen Zellen erkennbar sein, deren Aktivität in 4 Zellkompartimenten vorkommt (Mitochondrien, Microbodies, Plastiden und Cytosol, Abb. 1). Die Aktivitäten dieser Enzyme beruhen auf Isoenzymen. Die Funktion der Enzyme besteht in einem Ausgleich von Redoxäquivalenten zwischen diesen 4 Zellkompartimenten. Hierbei können das Coenzym NADH bzw. NAD^+ nicht die intrazellulären Membransysteme permeieren, wohl aber die meisten anderen Sub-

strate dieser Enzyme (Malat, Aspartat usw.). Diese mehrfache Kompartimentierung von Enzymen wirkt natürlich vermehrt die Frage nach der Koordinierung zwischen den Zellbereichen und deren Organisation auf den verschiedenen Ebenen der Genexpression auf.

Ein weiteres eindrucksvolles Beispiel für das Vorkommen einer bestimmten physiologischen Leistung in mehreren Zellkompartimenten ist die intrazelluläre Kompartimentierung der Glykolyse, Gluconeogenese und des oxidativen Pentosephosphatzyklus. Für jede Reaktion dieser Stoffwechselwege existieren je 2 Isoenzyme, von denen eines im Cytosol und das andere in den Chloroplasten lokalisiert ist (Tab. 1).

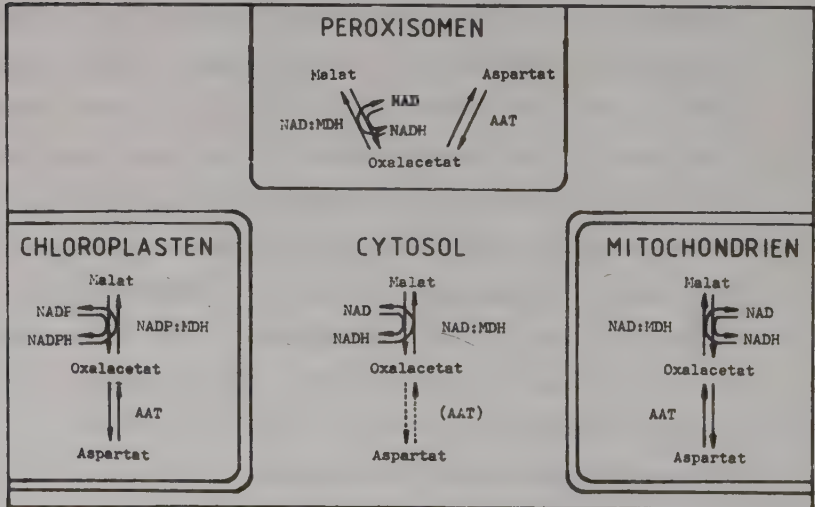


Abb. 1: Die intrazelluläre Verteilung der Malatdehydrogenase (MDH) und Aspartat Aminotransferase (AAT) in C₃-Pflanzen. Es gibt noch keine Evidenz für die cytosolische Aspartat Aminotransferase in C₃-Pflanzen, jedoch für einige C₄-Pflanzen (nach Schnarrenberger und Fock, 1976).

Tab. 1: Enzyme der Glykolyse, Gluconeogenese und des Pentose-phosphatzyklus, die in höheren Pflanzen als Isoenzyme im Cytosol und in den Chloroplasten vorkommen

Enzym	Pflanzengewebe	Referenz
Phosphoglucomutase	Spinatblätter	Mühlbach und Schnarrenberger (1978)
	Spinat- und Erbsenpollen	Weeden und Gottlieb (1980a)
	Ricinus, Endosperm	Nishimura und Beevers (1981)
Glucose-6-phosphat Dehydrogenase	Erbsenblätter	Anderson et al. (1974)
6-Phosphogluconat Dehydrogenase	Spinatblätter	Schnarrenberger et al. (1973)
	Ricinus, Endosperm	Simcox und Dennis (1978)
	Endosperm	Nishimura und Beevers (1981)
Glucosephosphat Isomerase	Spinatblätter	Schnarrenberger und Oeser (1974)
	Ricinus, Endosperm	Nishimura und Beevers (1981)
Ribosephosphat Isomerase	Erbsenblätter	Anderson (1971)
Phosphofructokinase	Spinatblätter	Kelly und Latzko (1977)
	Ricinus, Endosperm	Garland u. Dennis (1980)
		Nishimura und Beevers (1981)
Hexosediphosphatase	Spinatblätter	Latzko et al. (1974)
	Ricinus	Nishimura und Beevers (1981)
Fructose-bisphosphat Aldolase	Erbsenblätter	Anderson und Advani (1970)
Triosephosphat Isomerase	Erbsenblätter	Anderson und Advani (1970)
	Ricinus	Miernyk u. Dennis (1982)
Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase	Spinatblätter	Heber et al. (1963)
	Ricinus, Endosperm	Miernyk u. Dennis (1982)
Phosphoglycerat Kinase	Erbsenblätter	Anderson und Advani (1970)
	Ricinus	Miernyk u. Dennis (1982)

Auch hier können viele Coenzyme bzw. Substrate wie NADPH, NADP⁺, ATP, ADP, C₄⁻, C₅⁻, C₆⁻ und C₇-Zucker nicht oder nur ganz begrenzt die Chloroplastenhüllmembran permeieren und nur einige wenige wie Phosphat, 3-Phosphoglycerat, Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehydphosphat über den Phosphat-Translocator in hoher Rate transportiert werden (Heldt, 1976).

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mich mit den Isoenzymen der Fructose-bisphosphat Aldolase beschäftigt. Unter Isoenzyme werden hier genetisch unterschiedliche Enzyme verstanden, die dieselbe Reaktion katalysieren und nicht etwa multiple Formen eines Enzyms, die durch posttranslationale Modifikation entstanden sind (Scandalios, 1974). Die genetische Grundlage für die Kompartiment-spezifischen Isoenzyme des Zuckerphosphat-Stoffwechsels ist durch entsprechende Untersuchungen nachgewiesen (Anderson und Levin, 1970; Gottlieb, 1973; Torres et al., 1978; Gottlieb und Weeden, 1979; Hart, 1979; Tanksley und Rick, 1980; Torres und Tisserat, 1980; Weeden und Gottlieb, 1980b).

Wie in den Pflanzen im Laufe ihrer phylogenetischen Entwicklung die Isoenzyme gebildet oder erworben worden sind, ist Gegenstand intensiver Forschung über die Evolution pflanzlicher Zellen. Zwei Theorien stehen hier zur Diskussion. Nach der Genduplikationstheorie (Allsopp, 1969; Parthier, 1975) werden Isoenzyme von Genen codiert, die aus einem Vorläufergen einer einzelnen Zelle durch Genduplikation hervorgegangen sind. Im Laufe der Evolution haben sich diese Gene unabhängig voneinander durch Mutation immer mehr verändert. Die Endosymbiontentheorie

(Schimper, 1983; Margulis, 1970) auf der anderen Seite basiert auf der Annahme, daß ein photosynthetischer Prokaryont, den rezenten Cyanobakterien ähnlich, in eine eukaryontische Zelle eingewandert ist. Diese neu entstandene eukaryontische Zelle hatte damit 2 Enzymsätze, die des prokaryontischen Symbionten und die der eukaryontischen Wirtszelle.

In Abb. 2 ist ein Schema für die Phylogenie von homologen Isoenzymen gemäß der Genduplikations- und Endosymbiontentheorie dargestellt. Die Entwicklung der Plastid-spezifischen Isoenzyme durch Genduplikation hätten nach der Spaltung von Pflanzen und Tieren vor 1 Milliarde bis

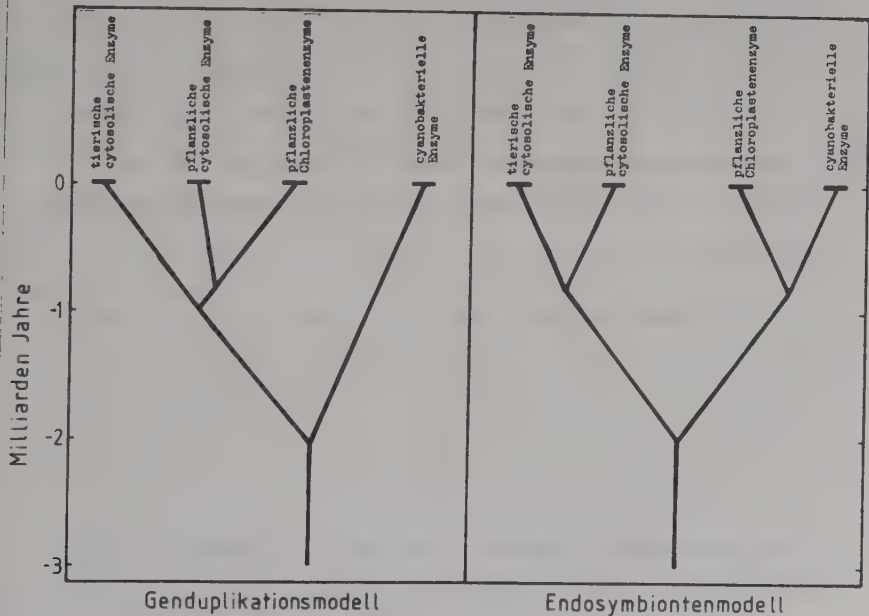


Abb. 2: Vergleich der relativen Zeiten der Divergenz zwischen homologen Enzymen nach dem Genduplikations- und dem Endosymbiontenmodell (nach Weeden, 1982) modifiziert.

700 Millionen Jahren (Schwartz und Dayhoff, 1978) erfolgen müssen, da Tiere in der Regel nur ein cytosolisches Enzym, Pflanzen dagegen zusätzlich ein Plastidenenzym besitzen. Unter der Annahme gleicher Mutationsraten für die homologen Enzyme müßten die pflanzlichen Isoenzyme dann die größte Ähnlichkeit miteinander haben, die der Tiere müßten mehr divergent und die der Cyanobakterien noch mehr divergent sein.

Im Falle der Endosymbiontentheorie ist zu erwarten, daß die Entwicklung der cytosolischen und Plastidenenzyme seit der Trennung in Pro- und Eukaryonten vor 1,5 bis 3 Milliarden Jahren voneinander getrennt ablief, während die Spaltung der Pflanzen und Tiere und somit auch die der cytosolischen Enzyme viel später erfolgte. Die Chloroplastenenzyme müßten dann mit den Enzymen aus Cyanobakterien eine Gruppe strukturell ähnlicher Proteine bilden und die tierischen und pflanzlichen Cytosolenzyme eine andere.

Mehrere Isoenzympaare aus Chloroplasten und dem Cytosol von Pflanzen sind bereits früher unter dem gerade angeführten Evolutionsaspekt auf strukturelle Unterschiede hin untersucht worden, nämlich die Glycerinaldehyd-phosphat Dehydrogenase (Cerff und Chambers, 1979), die Glucosephosphat Isomerase (Herbert und Schnarrenberger, 1982; Weeden, 1982) und die Aldolase (Anderson et al., 1975). Die Befunde über die Glycerinaldehyd-phosphat Dehydrogenase und Glucosephosphat Isomerase sprechen für eine Entwicklung dieser Isoenzyme nach der Endosymbionten-

theorie, da sie strukturell sehr große Unterschiede in ihrer Primärstruktur aufweisen müssen. Eine Ausnahme scheinen jedoch die Isoenzyme der Aldolase zu bilden. Die Aldolase-Isoenzyme aus Pflanzen wie auch die tierischen Aldolasen sind Klasse I-Enzyme, d.h. sie benötigen keine Metallionen (Brooks und Criddle, 1966; Jacobi, 1967), während die aus Cyanobakterien Klasse II-Metalloenzyme sind (Willard und Gibbs, 1968). Auch nach den Ergebnissen von Anderson et al. (1975) und Anderson (1979) sind die beiden pflanzlichen Aldolase-Isoenzyme strukturell aufgrund ihrer relativen Molekülmassen und ihrer Aminosäurezusammensetzungen eher sehr ähnlich. Sie lassen daher eine Entstehung gemäß der Genduplikationstheorie erwarten. Die entscheidenden Experimente fehlen aber noch, um diesen Schluß eindeutig ziehen oder widerlegen zu können.

Das Ziel dieser Arbeit sollte es deshalb sein, Aldolase-Isoenzyme aus grünen Blättern eindeutig zu trennen und bis zur Homogenität zu reinigen. Die gereinigten Isoenzyme sollten dann strukturell miteinander und mit Aldolasen aus anderen Organismen verglichen werden. Hierzu sollten immun- und proteinchemische Methoden angewendet werden. Die Analyse sollte dabei zur Entscheidung beitragen helfen, ob aufgrund von strukturellen Unterschieden oder Homologien die Evolution der Aldolase nach der Genduplikationstheorie oder der Endosymbiontentheorie erfolgt ist. Für eine spätere molekulare biologische Analyse der Primärstrukturen sollte darüber hinaus die Expression der Aldolasen in keimenden Pflanzen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Spinat (Spinacia oleracea L.), Erbsen (Pisum sativum L.), Mais (Zea mays L.) Portulaca oleracea L. und Dryopteris filix-mas L. (Schott.) wurden im Garten des Institutes angezogen. Mnium cuspidatum (Dill.) stammt von einer Wiese in Berlin-Dahlem.

2.2 Reinigung der Aldolasen aus Spinat

2.2.1 Herstellung eines Rohhomogenats

Alle Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Spinat wurde von der Mittelrippe befreit und in destilliertem Wasser gewaschen. Das Material (1 kg) wurde in 2 l Homogenisationsmedium (20 mM K_2HPO_4 , 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,6) in einem Waring blender (Waring Prod. Div., New Hartford, USA) 1 min bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenat wurde durch ein Leinentuch gepreßt, um grobe Zelltrümmer zu entfernen. Polyethylenimin in einer Endkonzentration von 0,1 % wurde hinzugefügt und 15 min gerührt, um spezifisch die Thylakoide zu fällen (P.H. Quail, persönliche Mitteilung). Anschließend wurde das Homogenat 20 min bei 10 000 Upm im GSA-Rotor einer Sorval RC 2-B-Zentrifuge (Du Pont de Nemours, Bad Nauheim) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen.

2.2.2 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

Der Überstand wurde mit 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,6, in bidestilliertem Wasser so verdünnt, daß die Konduktivität 2,5 mS betrug. Der pH wurde auf 8,6 eingestellt. Die Proteine wurden in einem Batch-Verfahren auf einer Fritte an 1,5 l DEAE-Cellulose (DE 32, Whatman Ltd./Maidstone/Kent, England) gebunden, das mit Homogenisationsmedium (s.O.) äquilibriert war. Die DEAE-Cellulose wurde in eine Glassäule von 8 cm Durchmesser gepackt. Die Proteine wurden mit 4 l eines KCl-Gradienten von 0-0,4 M in 20 mM K_2HPO_4 , 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,6, eluiert. Fraktionen von 25 ml wurden im Fraktionssammler (Gilson, TDC 220 A, Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, Frankreich) gesammelt. Die Fraktionen mit Aldolaseaktivität in beiden Peaks wurden getrennt weiter verarbeitet.

2.2.3 Affinitätschromatographie an Cellulosephosphat

Für die Affinitätschromatographie an Cellulosephosphat (Heil und Lebherz, 1978) wurden die Proteine konzentriert durch Fällern mit $(NH_4)_2SO_4$ in einer Endkonzentration von 70 % und Lösen in Tris-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,3) oder in Imidazol (10 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 6,5) und 12 Stunden mit zweimaligem Wechsel gegen diese Puffer dialysiert. Zwei Glassäulen von 2,8 x 30 cm und 4 x 30 cm wurden mit 150 ml bzw. 350 ml Cellulosephosphat (P 11, Whatman Ltd., Maidstone/Kent, England) gefüllt, das mit dem

Tris-Puffer bzw. Imidazol-Puffer (s.o.) äquibriert war. Die Präparation der zuerst an der DEAE-Cellulose eluierten Aldolase wurde an die kleinere, ein Viertel der anderen Präparation an die größere Cellulosephosphat-säule gebunden. Es wurde mit Tris-Puffer bzw. Imidazol-Puffer (s.o.) gewaschen, bis die Extinktion des Durchflusses kleiner als 0.005 war. Dann wurden die Aldolasen mit 0,1 mM Fructose-1,6-bisphosphat in Tris- bzw. Imidazol-Puffer eluiert. Nach der Elution wurde die große Säule mit 100 ml Tris- oder Imidazol-Puffer gewaschen und der Vorgang des Beladens, Waschens, Eluierens und Waschens noch dreimal mit dem Rest der Aldolasepräparation der DEAE-Cellulose-Säule wiederholt. Die Fraktionen mit Aldolaseaktivität wurden gesammelt, konzentriert durch Dialyse gegen Polyethylenglykol 20000 (Karl Roth KG, Karlsruhe) und anschließend gegen 20 mM K_2HPO_4 , 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5, dialysiert.

2.2.4 Ultrazentrifugation in Saccharosegradienten

In einigen Fällen führte die Affinitätschromatographie an Cellulosephosphat bei den Chloroplasten-Aldolasen nicht zu vollständig homogenen Proteinen. Eine Zentrifugation im Saccharosegradienten war dann erforderlich. Ein linearer Saccharosegradient von 0 % bis 30 % (w/v) in 20 mM K_2HPO_4 , 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5, wurde hergestellt, indem 15 % (w/v) Saccharose im oben genannten Puffer in vertikal gestellte Cellulosenitrat-Zentrifugationsröhrchen (12 ml)

eingefroren und wieder aufgetaut wurde. Nach Beladen von 2-6 Röhrchen mit je ca. 1 ml Proteinlösung wurde in einem SW 41 Ti-Rotor einer Beckman-Zentrifuge (Beckman, Spinco L2 65 B) bei 40 000 Upm, 14 h zentrifugiert. Fraktionen von je 0,7 ml wurden von oben mit einer Pipette abgehoben und auf Aldolaseaktivität getestet. Die Fraktionen mit den höchsten Aldolaseaktivitäten wurden zusammengegeben und durch Dialyse gegen Polyethylenglykol eingeeengt.

Zum längeren Aufbewahren wurden die Aldolaselösungen mit 87 %igem Glycerin auf das 1,6-fache des Volumens verdünnt und bei -20°C gelagert. Das Einfrieren ohne Glycerin bewirkt eine totale Inaktivierung der Enzyme.

2.2.5 Reinigung der Aldolasen aus anderen Pflanzen

Es wurden folgende Mengen an Pflanzenmaterial und Homogenisationspuffer (20 mM K_2HPO_4 , 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,6) verwendet:

Mais:	100 g Blätter und 400 ml Homogenisationspuffer
<u>Portulaca oleracea</u> :	100 g Blätter und 200 ml Homogenisationspuffer
Erbse:	100 g Blätter und 400 ml Homogenisationspuffer
<u>Dryopteris filix-mas</u> :	100 g Blätter und 400 ml Homogenisationspuffer

Bei der Präparation von Portulaca oleracea, Dryopteris filix-mas und Mnium cuspidatum wurden dem Homogenisationspuffer Polyvinylpyrrolidon in einer Endkonzentration von 1 % zugefügt, um Phenoloxidasen zu hemmen. Auf eine

Chlorophyllfällung mit Polyethylenimin wurde verzichtet. Die Reinigung der Aldolasen durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose und Affinitätschromatographie an Cellulosephosphat erfolgt wie bei der Reinigung der Spinataldolasen; es wurde nur entsprechend weniger Säulenmaterial verwendet.

2.3 Isolierung von Chloroplastenproteinen

Chloroplasten aus Spinat wurden nach einer modifizierten Methode von Jensen und Bassham (1966) isoliert. 200 g Spinatblätter ohne Mittelrippe wurden in 400 ml Homogenisationsmedium (0,1 M Glycylglycin, 1 mM MnCl_2 , 1 mM MoCl_2 , 2 mM EDTA, 1 mM KNO_3 , 5 mM K_2HPO_4 , 10 mM β -Mercaptoethanol, 2 mM Na-Ascorbat und 0,4 M Sorbit, pH 7,0) für 7 s bei halbmaximaler Geschwindigkeit in einem Waring blender homogenisiert. Das Homogenat wurde durch zwei Lagen Miracloth (Chicopee Mills, Milltown, N.J., USA) gepreßt und 2 min bei 1600 Upm in einer Minifuge 2 (Heraeus Christ GmbH, Osterode) zentrifugiert, um grobe Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde 2 min bei 4000 Upm zentrifugiert und der Niederschlag in Homogenisationsmedium suspendiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Niederschlag in demselben Puffer ohne Sorbit aufgenommen. Die Suspension wurde so lange beschallt (Sonifier B 12, Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA), bis die Chloroplasten zerstört waren, was mikroskopisch überprüft werden konnte. Anschließend

wurde die Suspension bei 20 000 Upm im SS 34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,6, bis zu einer Konduktivität von 2,5 mS verdünnt und die Aldolasen durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose und Affinitätschromatographie an Cellulosephosphat, wie zuvor beschrieben, gereinigt.

2.4 Enzymteste, Chlorophyll- und Proteinbestimmung

Die photometrischen Messungen wurden bei Zimmertemperatur an einem Eppendorf Photometer 1101 M (Eppendorf-Gerätebau Netherer und Hinz, Hamburg) und an einem Spektralphotometer Zeiss PMQ II (Carl Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden an einem Eppendorf-Kompensations-schreiber, Typ 65 11, und an einem Abimed Linear Schreiber (Abimed Analysen-Technik GmbH, Düsseldorf) registriert.

Feinchemikalien wurden von Boehringer (Mannheim) und von Sigma (Chemie GmbH München) bezogen.

Alle Tests wurden, soweit nicht anders vermerkt, in 1 ml-Testansätzen durchgeführt und bei 340 nm gemessen. Für NADH bzw. NADPH wurde ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,22 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ verwendet.

Fructose-bisphosphat Aldolase (EC 4.1.2.13)

Testansatz nach Wu und Racker (1959):

5 mM Tris HCl, pH 7,5

1 mM EDTA

210 μ M NADH

1 unit Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase

1 unit Triosephosphat Isomerase

2 mM Fructose 1,6-bisphosphat

Enzym

Fructose-bisphosphat Aldolase mit Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehydphosphat als Substrat

Testansatz nach Fluri et al. (1967)

50 mM Triethanolamin, pH 7,4

0,5 mM EDTA

0,5 mM NADP

1 mM $MgCl_2$

5 μ g Glucose-6-phosphat Dehydrogenase

5 μ g Phosphoglucose Isomerase

10 1g Triosephosphat Isomerase

0,3 units Fructose-1,6-bisphosphatase

Dihydroxyacetonphosphat in verschiedenen
Konzentrationen

Enzym

Alcohol Dehydrogenase (EC 1.1.1.1)

Testansatz nach Racker (1955)

0,02 M Tris/HCl, pH 8,8

250 μ M NAD^+

0,03 ml Ethanol (99 %ig)

Enzym

Catalase (EC 1.11.1.6)

Testvolumen: 3 ml

Wellenlänge: 240 nm

Extinktionskoeffizient: $E_{240} = 42 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$

Testansatz nach Lück (1965)

12,5 mM H_2O_2

67 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 7,0

Enzym

Enolase (EC 4.2.1.11)

Testansatz nach Czok (1970)

0,1 M Triäthanolamin, pH 7,6

3 mM EDTA

1,25 mM ADP

10,5 mM MgSO_4

30 mM KCl

210 μM NADH

1 unit Pyruvat Kinase

1 unit Lactat Dehydrogenase

2 mM 2-Phosphoglycerat

Enzym

Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)

Testansatz nach Schnarrenberger et al. (1973)

40 mM Tris/HCl, pH 8,0

7,5 mM MgCl_2

250 μM NADP^+

1 mM Glucose 6-phosphat

Enzym

Glycerinaldehyd-phosphat Dehydrogenase (NADP⁺-phosphorylierend) (EC 1.2.1.13)

Testansatz nach Heber et al. (1963)

0,1 M Tricine, pH 7,5
 1 mM MgCl₂
 5 mM DTE
 350 µM NADP
 1,1 mM ATP
 1 unit Phosphoglycerat Kinase
 9 mM Phosphoglycerat
 0,015 % Triton-X-100
 Enzym

Hydroxypyruvat Reductase (EC 1.1.1.81)

Testansatz nach Tolbert et al. (1969)

40 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 6,2
 250 µM NADH
 1 mM Hydroxypyruvat
 Enzym

Chlorophyllbestimmung

Die Chlorophyllkonzentration wurde nach Arnon (1949) ermittelt. Eine 1 ml Probelösung wurde mit 4 ml Aceton gemischt und 5 Stunden bei 0-4°C im Dunkeln gehalten. Die Extinktion wurde anschließend bei 652 nm gemessen und der Chlorophyllgehalt nach folgender Formel ausgerechnet:

$$\text{mg Chlorophyll/ml} = \text{OD}_{652} \cdot \frac{1}{34.5} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry (1951) durchgeführt. 1 ml Proteinlösung wurden mit 5 ml Lösung A (2 % NaCO_3 in 0,1 n NaOH, 1 % CuSO_4 und 2 % Na-K-Tartrat im Verhältnis 100 : 1 : 1) 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Folin-Ciocalteus Phenol-Reagenz (1 : 2 mit Wasser verdünnt) wurde 30 min inkubiert und anschließend die Extinktion bei 660 nm gemessen. Anhand einer Eichkurve mit Rinderserum-Albumin konnte der Proteingehalt errechnet werden.

2.5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Polyacrylamid Gelelektrophorese in Polyacrylamid-Gradienten wurde nach der Methode von Neville (1971) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist in folgender Tabelle angegeben:

Stammlösung	Trenngel		Sammelgel
	7,5 %ig	15 %ig	6 %ig
Polyacrylamid/N,N'-Methylenbis-Acrylamid (30 %/0,8 % (w/v)	1,9 ml	3,8 ml	1,5 ml
2 M Tris/HCl, pH 9,2	1,5 ml	1,5 ml	-
0,5 M Tris/ H_2SO_4 , pH 6,1	-	-	0,75 ml
10 % SDS	75 μl	75 μl	75 μl
Glycerin	-	0,4 ml	-
H_2O	4,0	1,7 ml	5 ml
10 % Ammoniumpersulfat	25 μl	25 μl	150 μl

Das Trenngel mit einem Polyacrylamidgradienten von 7,5 bis 15 % wurde mittels eines Gradientenmischers über eine Pumpe zwischen zwei Glasplatten mit 1 mm Abstand gegeben. Die Fläche des Gels betrug 140 x 90 mm. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel aufgetragen.

Der Elektrodenpuffer der oberen Kammer enthielt 50 mM Tris/Borat, 0,1 % SDS, pH 8,6, der Elektrodenpuffer der unteren Kammer 0,4 M Tris/HCl, pH 9,2.

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0,2 % SDS 2 min in einem Wasserbad gekocht. Die Elektrophorese wurde bei 160 V durchgeführt. Die Proteine wurden mit 0,07 % Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg) in 45,4 % Methanol und 9,2 % Essigsäure angefärbt. Zum Entfärben des Gels diente 5 % Methanol und 7,5 % Essigsäure.

2.6 Bestimmung der relativen Molekülmassen

Bestimmung der rel. Molekülmassen durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde, wie gerade zuvor beschrieben, durchgeführt. Als Marker für die relative Molekülmassenbestimmung wurden folgende Proteine verwendet:

Protein	relative Molekülmasse
Carbonat Dehydratase	29 000
Rinderserumalbumin	68 000
<u>E. coli</u> RNA Polymerase	165 000, 155 000 und 39 000

Bestimmung der rel. Molekülmassen durch Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation

Die relativen Molekülmassen (M_r) der nativen Enzyme wurden mit Hilfe der Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation in Saccharosegradienten bestimmt (Martin und Ames, 1961). Es wurden Saccharosegradienten (Vol = 4,8 ml) gegossen, indem je 0,3 ml von einer 20, 19, ..., 5 %igen (w/w) Saccharoselösung in 20 mM K_2HPO_4 , pH 7,5 und 1 mM DTE übereinandergeschichtet wurden. 0,2 ml Aldolaselösung mit den Markerenzymen Catalase (M_r 240 000), Alcohol Dehydrogenase (M_r 141 000), Glucose 6-phosphat Dehydrogenase (M_r 116 000) und Hydroxypyruvat Reductase (M_r 92 000) wurden auf den Gradienten aufgetragen und 13 h bei 40 000 UpM im SW 65 K-Rotor einer Beckman L2/65 Ultrazentrifuge bei 5°C zentrifugiert. Die Röhrchen wurden anschließend mit einer Injektionsnadel am Boden angestochen, Fraktionen zu jeweils 11 Tropfen wurden in insgesamt 40 Röhrchen gesammelt und in diesen die Aktivität der Enzyme getestet.

2.7 Aminosäureanalyse und Peptidkartierung

Für die Aminosäureanalyse wurden je 0,2 mg der gereinigten cytosolischen und Chloroplastenaldolase aus Spinatblättern gegen 3 %ige Essigsäure dialysiert. Die Proteine wurden anschließend hydrolysiert, indem sie mit 6 N HCl 22 h bei 110°C in Einschlußröhrchen inkubiert wurden. Das Hydrolysat wurde mit dem Aminosäureanalysator Durrum D 500 (USA) auf die Aminosäurezusammensetzung untersucht.

Zur Peptidkartierung wurden je 0,5 mg der gereinigten cytosolischen und Chloroplastenaldolase aus Spinatblättern gegen destilliertes Wasser dialysiert. Das Protein wurde gefriergetrocknet und in 100 µl 0,1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ gelöst. Es wurde je 10 µg festes Trypsin zugegeben und 2 h bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Lyophilisierung wurden die gespaltenen Enzyme in 50 µl 50 %igem destilliertem Pyridin gelöst. Davon wurde 1 µl auf eine Celluloseplatte (DC-Plastikfolie, Cellulose, 20 x 20 cm, Merck, Darmstadt) gebracht. Die Celluloseplatte wurde mit Ausnahme der Auftragstelle mit Elektrophoresepuffer (10 % Essigsäure + 10 % Ameisensäure, pH 1,9) durchtränkt und die Peptide unter Kühlung 1,5 h bei 400 V in einer Desaga Desaphor Elektrophorese-Apparatur (Desaga, Heidelberg) elektrophoretisiert. Nach Trocknen der Platten wurden die Peptide in der anderen Richtung durch Chromatographie aufgetrennt. Als Laufmittel diente 75 ml Butanol, 50 ml Pyridin, 15 ml Essigsäure und 60 ml destilliertes Wasser. Nach dem Trocknen wurden die Peptide mit 0,2 % Ninhydrin in 80 % Aceton und Trocknen bei 80°C angefärbt.

2.8 Herstellung von Antikörpern

Antikörper gegen die Aldolasen aus Chloroplasten und dem Cytosol von Spinatblättern wurden aus Meerschweinchen und einem Kaninchen gewonnen. Die Tiere stammten vom Bundesgesundheitsamt Berlin. Je 100 µg gereinigtes Protein wurde den Tieren unter die Haut und ins Muskelgewebe gespritzt. Die erste Injektion enthielt Freundesches

complete Adjuvans (Grand Island Biological Company, Grand Island, New York, USA), die übrigen wurden im wöchentlichen Abstand 3 Wochen später durchgeführt und enthielten Freundsches incomplete Adjuvans. Drei Tage nach der letzten Injektion wurde dem Kaninchen Blut aus dem Ohr mit Hilfe einer Saugflasche, den Meerschweinchen durch Herzpunktion entnommen. Das Blut wurde 12 h bei 4°C gehalten und anschließend bei 3000 Upm in einer Minifuge (Heraeus Christ GmbH, Osterode) zentrifugiert und das Antiserum abpipettiert.

2.9 Ouchterlony-Doppeldiffusionstest (Ouchterlony, 1949)

Petrischalen von 5 cm Durchmesser wurden mit 8 ml 1%igem (w/v) Agar-Agar in PBS (9,15 M NaCl und 0,15 M KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 , pH 7,2) gefüllt. Nach dem Erstarren des Agars wurde mit Hilfe eines Stanzers (Gel Punch, Gelman Instruments Co., Ann Arbor, Michigan, USA) 6 Löcher in einem Kreis im Abstand von 0,5 cm und ein Loch in die Mitte gestanzt. Zum Austesten der Antikörper bzw. der Antigene wurden in das mittlere Loch 20 µl Antiserum (oder eine entsprechende Antiserumverdünnung), in die äußeren jeweils 20 µl Antigen (oder Verdünnungen davon) gefüllt. Die Platten wurden ein bis zwei Tage bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Präzipitationsbanden wurden photographisch festgehalten.

2.10 Immuntitrationstest zur quantitativen Bestimmung der Antigen-Antikörper-Reaktion

20 μ l Antiserum (oder eine Verdünnung davon) wurden mit 20 μ l einer konstanten Menge Aldolaseaktivität 3 min bei Zimmertemperatur inkubiert, damit sich Antigen-Antikörper-Komplexe bildeten. Bei einer Modifikation dieses Tests wurde die Antiserumkonzentration konstant gehalten und Enzymaktivitäten in verschiedenen Verdünnungsstufen zugegeben. Anschließend wurden 5 μ l Immuno-Precipitin (Formalin fixierte Staphylococcus aureus Cowan I-Zellen, Bethesda Research Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA), das zweimal mit PBS gewaschen worden war, dazu pipettiert und weitere 3 min inkubiert. Bei diesem Schritt werden die Fc-Teile der Antikörper an das Protein A der Formalin-fixierten Staphylococcus aureus-Zellen gebunden (Kessler, 1975). Die Zellen mit den daran gebundenen Immunkomplexen wurden 1 min bei 5400 g in der Select-a-Fuge 24 (Biodynamics, Indianapolis, USA) abzentrifugiert. Die Enzymaktivität im Überstand wurde sodann getestet und als Prozent der eingesetzten Enzymaktivität gegen die logarithmisch aufgetragene Antiserummenge aufgetragen.

2.11 Aldolaseaktivität in verschiedenen Entwicklungs- stadien bei Spinat

Spinatsamen wurden in wöchentlichem Abstand ausgesät und in einer Klimakammer bei einem 10 h Tag/14 h Nacht-Rhythmus bei 4000 lux (Osram-L-Leuchtröhren 65 W/30 Sa) und 70 % relativer Luftfeuchtigkeit oder im Dunkeln gezogen. Nach 42 Tagen wurden die belichteten, nach 18 Tagen die Blätter der etiolierten Pflanzen getrennt nach Alter und nach Kotyledonen, Primär- und Sekundärblättern geerntet. Die Blätter wurden gezählt, gewogen und die mittleren Blattflächen bestimmt. Sie wurden sodann mit der doppelten Menge an 20 mM K_2HPO_4 , 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,6, im Waring blender homogenisiert und von diesem Extrakt die Chlorophyllmenge bestimmt. Anschließend wurde der Extrakt bei 15 000 Upm im SS 34-Rotor abzentrifugiert. Vom Überstand wurde die Aldolaseaktivität und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Proteine wurden, wie unter 2.2.2 beschrieben, über DEAE-Cellulose und einem KCl-Gradienten von 0-0,5 M in 20 mM K_2HPO_4 , 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,6, aufgetrennt, um anhand des Verteilungsprofils den Anteil der beiden Aldolase-Isoenzyme in den Blättern zu verschiedenen Entwicklungsstadien zu bestimmen. Eine Auftrennung der Proteine an DEAE-Cellulose wurde auch mit Spinatsamen, wie oben angegeben, durchgeführt. Die Samen wurden jedoch mit einem Ultra-Turrax (Janke und Kunkel GmbH und Co. KG, Staufen im Breisgau) homogenisiert.

3. Ergebnisse

3.1 Auftrennung von Aldolase-Isoenzymen aus Spinatblättern an DEAE-Cellulose

Zu Beginn der Arbeit war es von entscheidendem Interesse, über eine eindeutige und vor allem praktikable Methode zu verfügen, die Cytosol- und Chloroplasten-spezifischen Isoenzyme der Aldolase zu trennen. Nach mehreren Vorversuchen stellte sich heraus, daß Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose für die Trennung der Isoenzyme aus Spinat die Methode der Wahl darstellte.

Bei der Auftrennung der Proteine aus Spinatblättern an DEAE-Cellulose wurden zwei Maxima an Aldolaseaktivität erhalten (Abb. 3 A). Die erste Aldolaseaktivität eluierte bei einer KCl-Konzentration von 0,08 M, die zweite bei 0,13 M.

3.2 Intrazelluläre Verteilung der beiden Aldolase-Isoenzyme aus Spinatblättern

Um zu untersuchen, welche der beiden Aldolasen in den Chloroplasten lokalisiert ist, wurden Chloroplasten aus Spinat nach der Methode von Jensen und Bassham (1966) isoliert. Als Marker für Chloroplasten wurde die NADP^+ -abhängige Glycerinaldehyd-phosphat Dehydrogenase verwendet und als Marker für cytosolische Enzyme die Enolase. In Tab.2 sind die Gesamtaktivitäten der Aldolase, NADP -Glycerinaldehyd-phosphat Dehydrogenase und

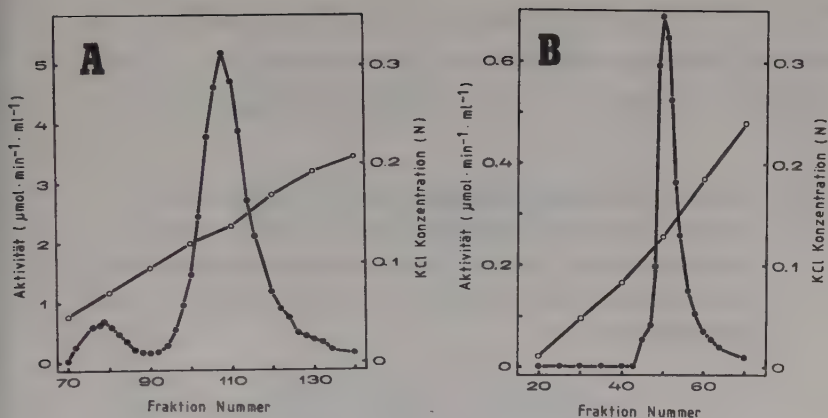


Abb. 3: Ionenaustausch-Chromatographie von Aldolasen von einem Rohextrakt (A) und von isolierten Chloroplasten (B) aus Spinatblättern an DEAE-Cellulose.
 (●) Aldolaseaktivität; (○) KCl Konzentration

Enolase für die Reinigungsschritte der Chloroplasten-isolierung angegeben. Im Vergleich zum Rohextrakt waren nur ca. 1 % der gesamten Enolaseaktivität, aber 44 % der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-phosphat Dehydrogenase-Aktivität in der Chloroplastenpräparation nachweisbar. Mit den Chloroplasten waren noch 20 % der gesamten Aldolase-Aktivität assoziiert. Die Auftrennung der Proteine aus den isolierten Chloroplasten an DEAE-Cellulose ergab nur ein Maximum für Aldolaseaktivität bei einer KCl-Konzentration von 0,13 M (Abb. 3B). Anhand eines Vergleichs der Elutionsprofile der Aldolasen aus den beiden Experimenten (Abb. 3A und 3 B) kann geschlossen werden, daß die als zweite eluierende Aldolase aus einem Rohextrakt (Abb. 3 A) ein Chloroplastenzym ist,

während die andere Aldolase aus dem Cytosol stammen muß. Die Chloroplastenaldolase repräsentiert 92 %, die cytosolische Aldolase 8 % der Gesamtalcoholaseaktivität.

Tab. 2: Aktivitäten der Aldolase, NADP⁺-abhängigen Glycerinaldehyd-phosphat Dehydrogenase (Chloroplastenmarker) und Enolase (Cytosol-Marker) im partikulären Rohextrakt und in isolierten Chloroplasten

	Aktivität [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$]		
	Aldolase	NADP ⁺ -Glycerinaldehyd-phosphat Dehydrogenase	Enolase
Rohextrakt	98	51,6	18,8
Chloroplasten	19,6	22,8	0,2

3.3 Reinigung der Isoenzyme der Aldolase aus Spinatblättern

Die Reinigung der cytosolischen Aldolase aus Spinatblättern erfolgte nach Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose durch Affinitätschromatographie an Cellulosephosphat mit 0,1 mM Fructose 1,6-bisphosphat als Elutionsmittel (Abb. 4 unten). Die Bindung der cytosolischen Aldolase an Cellulosephosphat gelang in Gegenwart von Tris/HCl, pH 7,3, bei jedem Versuch zuverlässig. Nach der Affinitätschromatographie war diese Aldolase homogen, wie durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese gezeigt werden konnte (Abb. 5). Die spezifische Aktivität betrug $7,18 \text{ units} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ und die Ausbeute betrug 9 % der Aldolaseaktivität im Rohextrakt.

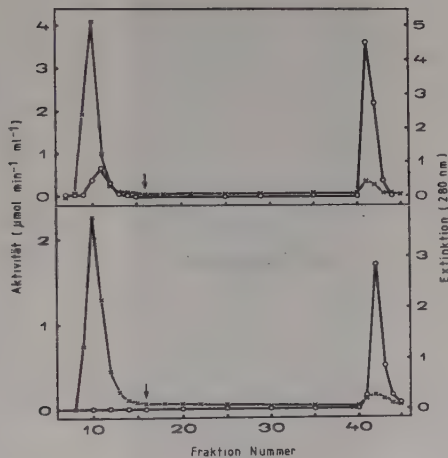


Abb. 4: Affinitätschromatographie der Chloroplasten- (oben) und der cytosolischen Adlolase (unten) aus Spinatblättern an Cellulosephosphat. Die Pfeile kennzeichnen den Beginn der Elution mit 100 μM Fructose 1,6-bisphosphat.
(o) Aldolaseaktivität;
(x) Protein, gemessen als Extinktion bei 280 nm

Die Chloroplastenaldolase wurde auch erst über Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose von der cytosolischen getrennt und anschließend durch Affinitätschromatographie an Cellulosephosphat gereinigt (Abb. 4 oben). Die Bindung der Chloroplastenaldolase mißlang in einigen Fällen bei Verwendung von 10 mM Tris, pH 7,3, jedoch erfolgte immer eine gute Bindung in Gegenwart von 10 mM Imidazolpuffer, pH 6,5. Die Aldolase wies bei der analytischen Gelelektrophorese in einigen Präparationen noch Verunreinigungen auf, vornehmlich als Bande in Höhe der Ribulose-bisphosphat Carboxylase. Eine Ultrazentrifugation in einem Saccharosegradienten

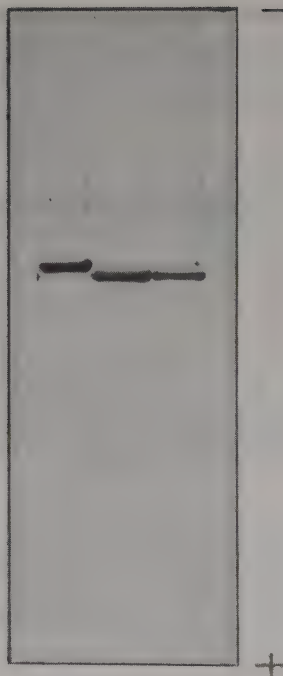


Abb. 5: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von gereinigten Aldolasen aus Spinatblättern. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue R 250 angefärbt. Linke Spur: cytosolische Aldolase aus einem Rohextrakt; mittlere Spur: Chloroplastenaldolase aus einem Rohhomogenat; rechte Spur: Aldolase aus einer Chloroplastenpräparation.

als weiteren Reinigungsschritt führte dann auch nach den Kriterien der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese zu homogenen Proteinen (Abb. 5). Die cytosolische Aldolase wanderte jedoch bei dieser Elektrophorese etwas weniger weit als die Chloroplastenaldolase. Die spezifische Aktivität des gereinigten Proteins betrug $7,8 \text{ units} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ und die Ausbeute 47 %, bezogen auf die Gesamtaktivität im Rohextrakt. Die Reinigungsschemata für die beiden Isoenzyme sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tab. 3: Reinigungsschema für die Fructose-bisphosphat Aldolasen aus einem Rohextrakt von Spinatblättern

Enzyme	Volumen ml	Gesamt- aktivität units	Protein mg	Spezifische Aktivität units · mg ⁻¹	Ausbeute %	Reinigung -fach
Spinat	2,500	1,370	12,500	0.11	100	1
Cytosol	410	157	1,230	0.13	9.8	1
Aldolase	75	149	21	7.18	9.3	65
Spinat	2,500	1,370	12,500	0.11	100	1
Chloroplasten	500	824	2,500	0.33	60	3
Aldolase	529	644	83	7.80	47	71

Die weitere Reinigung der Aldolase aus isolierten Chloroplasten (s.o.) an Cellulosephosphat führte ebenfalls zu homogenen Präparationen Abb. 5). Die Wanderungsgeschwindigkeit während der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese war dieselbe wie die der bereits oben als Chloroplastenenzym identifizierten Aldolase. Dieser Befund bestätigt den oben gezogenen Schluß, daß die an DEAE-Cellulose als zweites eluierende Aldolase das Chloroplastenenzym ist.

3.4. Bestimmung der relativen Molekülmassen der Aldolasen aus Spinatblättern

Um Information über die Größe und Struktur der beiden Spinataldolasen zu erhalten, wurden die relativen Molekülmassen durch Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation nach Martin und Ames (1961) bestimmt. Die Werte betrugen 143 000 für die cytosolische und 148 000 für die Chloroplastenaldolase (Abb. 6). Die relativen Molekülmassen der Untereinheiten wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt. Sie betrugen 38 000 für die cytosolische und 35 000 für die Chloroplastenaldolase (Abb. 7). Die Unterschiede in den relativen Molekülmassen waren zwar gering, jedoch gegensätzlich für die Untereinheiten und für die nativen Enzyme, obwohl dieselben Enzympräparationen zur Bestimmung der relativen Molekülmassen benutzt wurden. In jedem Fall sind beide Isoenzyme Tetramere mit identischen Untereinheiten. Da die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eher die korrekte relative Molekülmasse wiedergibt, kann man postulieren,

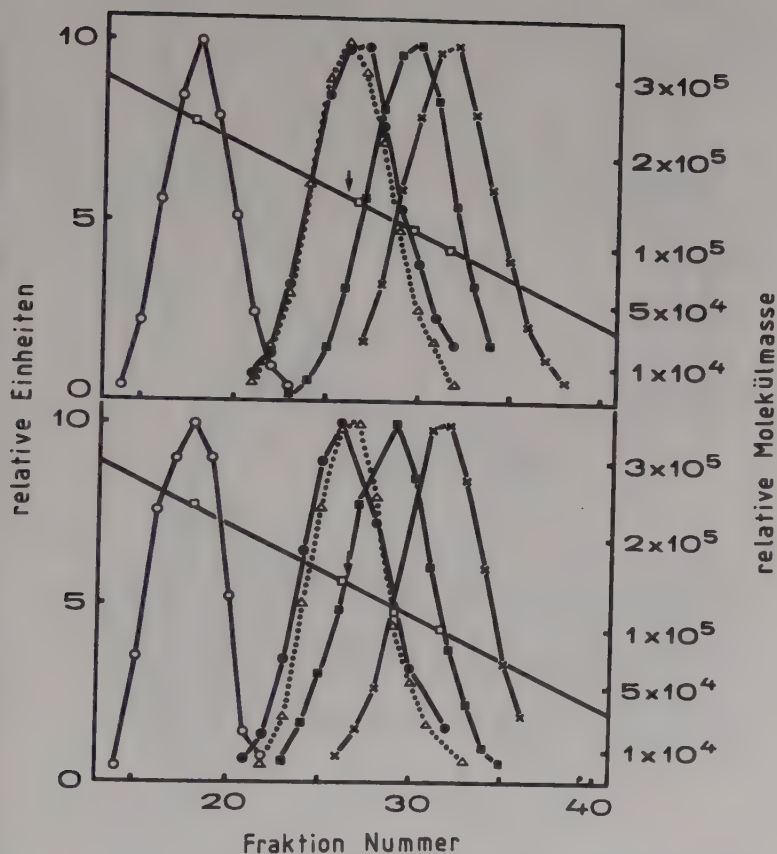


Abb. 6 : Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation der Chloroplastenaldolase (oben) und der cytosolischen Aldolase (unten) aus Spinat sowie einiger anderer Enzyme mit bekannter relativer Molekülmasse in Gradienten mit 5-20 % Saccharose.

○ Catalase; ● Alkohol Dehydrogenase;
 △ Aldolase; ■ Glucose-6-phosphat Dehydrogenase;
 x Hydroxypyruvat Reductase;
 ▽ relative Molekülmasse.

daß die cytosolische Aldolase von Spinat um ca. $4 \times 3\,000$ Dalton größer ist als die Chloroplastenaldolase.

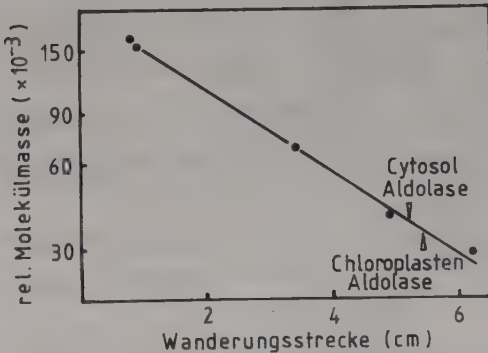


Abb. 7: Wanderungsstrecke der cytosolischen und Chloroplastenaldolase aus Spinatblättern sowie einiger Proteine bekannter relativer Molekülmassen nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Bestimmung der relativen Molekülmassen der Spinataldolasen. Als Marker dienten die 3 Untereinheiten der RNA-Polymerase aus *E. coli* sowie die Untereinheiten des Rinderserumalbumins und der Carbonat Dehydratase.

3.5 Reinigung der Aldolasen aus anderen Pflanzen

Eine Auftrennung der Proteine von Mais, Erbsen, Portulaca oleracea, Dryopteris filix-mas und Mnium cuspidatum an DEAE-Cellulose führte nur zu jeweils einem Maximum der Aldolaseaktivität bei KCl-Konzentrationen von 0,1 M bis 0,12 M (Abb. 8). Schultern in den Aktivitätsprofilen könnten als Anhaltspunkte für die Existenz von Isoenzymen wie bei Spinatblättern aufgefaßt werden. Bei weiterer

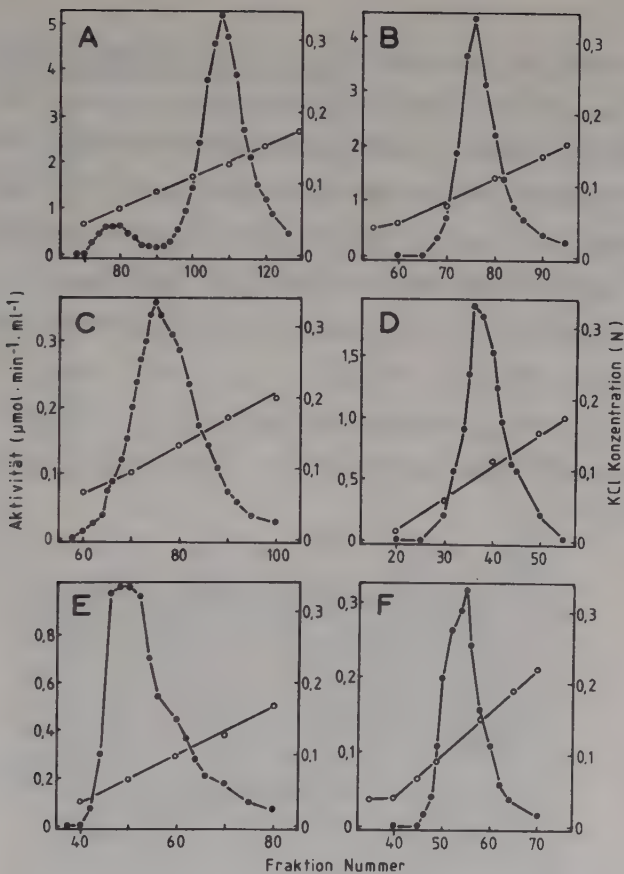


Abb. 8: Ionenaustausch-Chromatographie von Aldolasen aus Rohextrakten von verschiedenen Pflanzen an DEAE-Cellulose.

A Spinat; B Erbse; C Mais; D *Portulaca oleracea*; E *Dryopteris filix-mas*; F *Mnium cuspidatum*; ● Aldolaseaktivität; ○ KCl-Konzentration.

Reinigung der Aldolasen an Cellulosephosphat wurden nahezu homogene Proteinpräparationen erhalten. Die Mobilität bei der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese war dieselbe wie die der Chloroplastenaldolase aus Spinat. Dies ist ein Hinweis dafür, daß es sich bei den Enzymen aus diesen Pflanzen um Chloroplastenproteine handelt. Die spezifischen Aktivitäten dieser Aldolasen betrugen für Mais $6,4 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, Erbse $7,13 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, Portulaca oleracea $1,3 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, Dryopteris filix-mas $3,8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ und Mnium cuspidatum $2,81 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

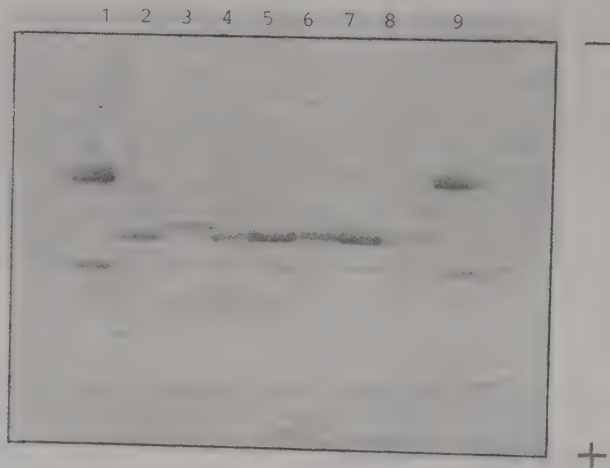


Abb. 9: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von gereinigten Aldolasen aus Spinat Chloroplasten (2); Spinat Cytosol (3); Erbse (4); Mais (5); Dryopteris filix-mas (6); Portulaca oleracea (7); Mnium cuspidatum (8). Die Spuren 1 und 9 enthielten die Marker Rinder serumalbumin und Carbonat Dehydratase.

3.6 Eigenschaften der Aldolasen

In Abb.10 sind die Aktivitäten der Fructose 1,6-bisphosphat-Spaltung der Aldolasen aus verschiedenen Pflanzen in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Alle Aldolasen haben nahezu identische pH-Abhängigkeiten mit einem breiten Optimum bei pH 7,5.

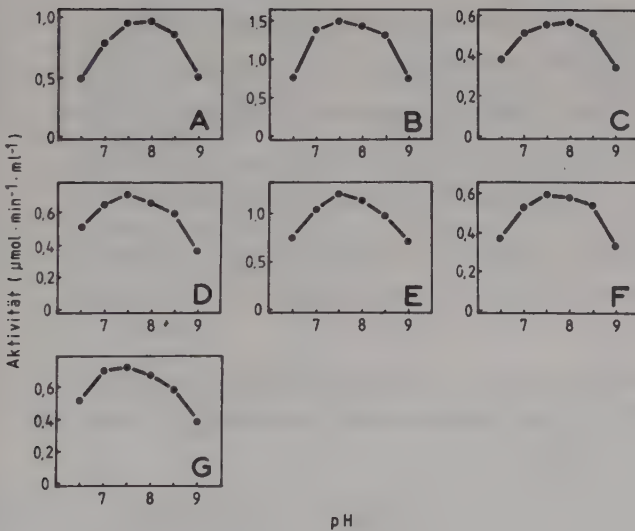


Abb. 10: Abhängigkeit der Aktivität von Aldolasen aus verschiedenen Pflanzen vom pH-Wert.

A Spinat, Chloroplasten; B Spinat, Cytosol;
C Erbsen; D Mais; E *Portulaca oleracea*;
F *Dryopteris filix-mas*; G *Mnium cuspidatum*

Zur Bestimmung der K_m -Werte für Fructose 1,6-bisphosphat wurden Substratkonzentrationen von 2 bis 100 μM Fructose 1,6-bisphosphat gewählt.

Die K_m -Werte und die maximalen Geschwindigkeiten (V) wurden aus Lineweaver-Burk-Diagrammen bestimmt (Abb. 10). Die Werte sind in Tab. 3 zusammengefaßt. Daraus geht hervor, daß die Cytosol-Aldolase aus Spinat eine viermal größere Affinität zu Fructose 1,6-bisphosphat hat als die Chloroplastenaldolase. Die K_m -Werte der Aldolasen aus den anderen untersuchten Pflanzen liegen in derselben Größenordnung wie der K_m -Wert der Chloroplastenaldolase aus Spinat. Dies kann ebenso wie die elektrophoretische Mobilität dahingehend interpretiert werden, daß es sich um ein Chloroplastenprotein der betreffenden Pflanze handelt. Die Werte für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V sind für die Spinatisoenzyme und das Erbsenenzym nahezu identisch, während die der übrigen Pflanzen kleiner sind. Die Ursache hierfür ist unklar.

Tab. 3: K_m - und V -Werte der gereinigten Aldolasen aus Spinat und einigen anderen Pflanzen für Fructose 1,6-bisphosphat

Aldolase aus	K_m -Wert [μM]	V_{max} [$\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$]
Spinat-Chloroplasten	10.5	7.0
Spinat-Cytosol	2.4	7.1
Erbse	9.1	7.7
Mais	7.1	3.3
<u>Portulaca oleracea</u>	7.0	1.25
<u>Dryopteris filix-mas</u>	9.1	4.4
<u>Mnium cuspidatum</u>	9.1	2.9

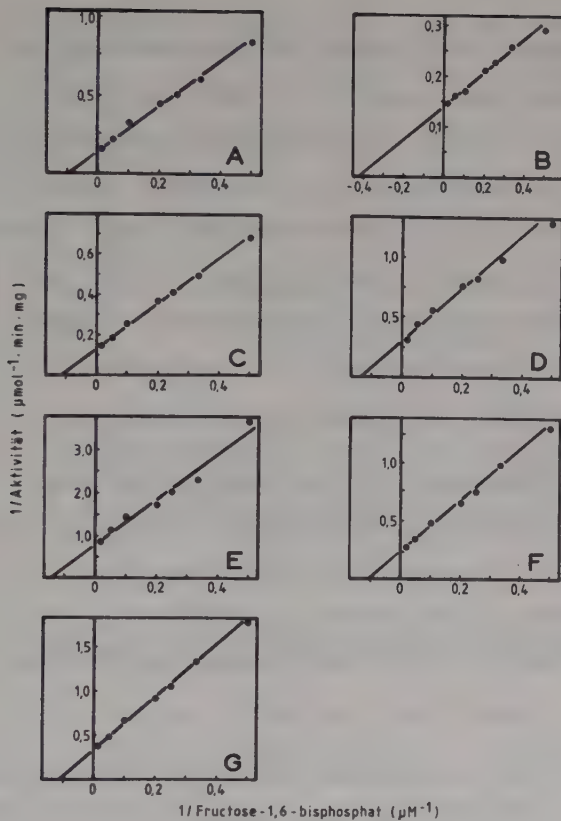


Abb. 11: Lineweaver-Burk-Diagramme für die Kinetiken der Aldolasen aus verschiedenen Pflanzen in Abhängigkeit von der Fructose 1,6-bisphosphat-Konzentration.
A Chloroplastenaldolase aus Spinat; B cytosolische Aldolase aus Spinat; C Erbse; D Mais; E *Portulaca oleracea*; F *Dryopteris filix-mas*; G *Mnium cuspidatum*

Zur Bestimmung der K_m -Werte der Aldolasen aus Spinat für das Substrat Glycerinaldehydphosphat wurde Dihydroxy-acetonphosphat in verschiedenen Konzentrationen in Gegenwart von überschüssiger Aktivität an Triosephosphat

Isomerase verwendet. Dabei setzt die Triosephosphat Isomerase Dihydroxyacetonphosphat in Glycerinaldehydphosphat um, wobei der Anteil an Dihydroxyacetonphosphat 95,45 % beträgt (Beisenherz, 1955). Unter der Annahme, daß die K_m -Werte für Glycerinaldehydphosphat und Dihydroxyacetonphosphat in derselben Größenordnung liegen, kann man einen K_m -Wert für Glycerinaldehydphosphat bestimmen, da dieses von den beiden Substraten in der erheblich geringeren Konzentration vorliegt.

Die K_m -Werte für das Substrat Dihydroxyacetonphosphat konnte nicht enzymatisch bestimmt werden. Der Grund hierfür lag darin, daß die betreffenden Kopplungsenzyme so hohe Triosephosphat Isomerase-Aktivitäten besaßen, daß eindeutige Messungen unter diesen Bedingungen nicht möglich waren.

Aus der Abb. 12 wird ersichtlich, daß sowohl die Chloroplasten- als auch die cytosolische Aldolase aus Spinat durch hohe Substratkonzentrationen gehemmt werden (Substrathemmung). Aus den Schnittpunkten der Regressionsgeraden bei niedrigen Substratkonzentrationen mit der Abszisse lassen sich unter der oben genannten Bedingung die K_m -Werte für Glycerinaldehydphosphat berechnen. Sie betragen für die Chloroplastenaldolase 91 μM und für die cytosolische Aldolase 32 μM .

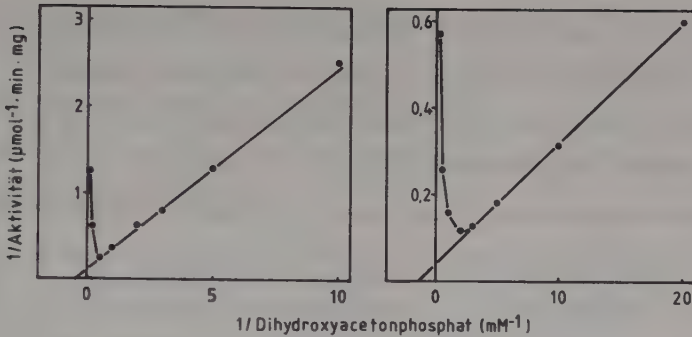


Abb. 12: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetiken der Chloroplastenaldolase (links) und der cytosolischen Aldolase (rechts) aus Spinatblättern in Abhängigkeit von verschiedenen Dihydroxyacetonphosphat-Konzentrationen und in Gegenwart von 1 U Triosephosphat Isomerase.

3.7 Vergleich der Aldolasen mit immunchemischen Methoden

Um die verschiedenen Aldolasen immunchemisch zu vergleichen, wurde der Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (1949) und ein in unserem Labor entwickelter, quantitativer Immuntitrationstest mit Staphylococcus aureus-Zellen angewendet. Bei der zuletzt genannten Methode wurde zunächst Enzym und Antikörper zusammengegeben, damit sich Immunkomplexe bildeten. Diese wurden anschließend mit Hilfe von Staphylococcus aureus Cowan I-Zellen, die spezifisch an den F_c -Teil der Antikörper binden, abzentrifugiert. Die nicht gebundene Aktivität im Überstand wurde dann gemessen und als Prozent der Ausgangsaktivität gegen die Serumverdünnung oder die Ausgangsaktivität aufgetragen. Zur Dokumentation, ob dieser Immuntitrationstest mit Staphylococcus aureus Cowan I-

Zellen für quantitative Bestimmungen der Kreuzreaktion von Enzymen geeignet ist, wurden zwei Versuche konzipiert: Einmal wurde der Immuntitrationstest mit 5 verschiedenen Verdünnungsstufen von 1:1 bis 1:16 der Chloroplastenaldolase aus Spinat mit jeweils mehreren Antiserumverdünnungen durchgeführt. Die Abb. 13 zeigt, daß die Kurven für die 5 verschiedenen Enzymverdünnungen parallel verlaufen und die Abstände voneinander jeweils einem Faktor 2 der Serumverdünnungen entsprechen. Damit besteht also eine direkte Korrelation zwischen der Antigen- und Antikörperverdünnung, d.h. wenn die Aldolase um einen bestimmten Betrag verdünnt wurde, konnte das Antiserum um denselben Betrag verdünnt werden, um denselben Prozentsatz an Aktivität im Überstand zu erhalten.

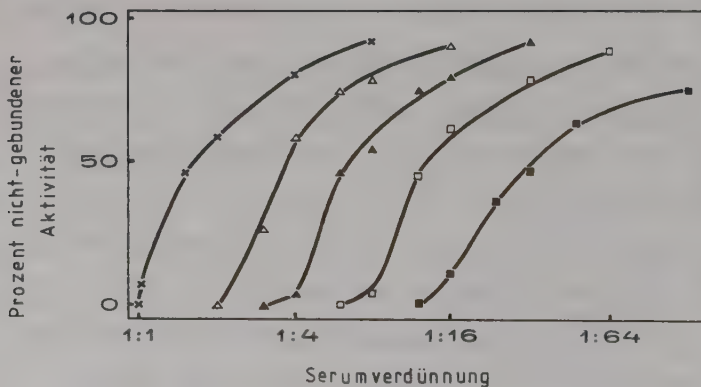


Abb. 13: Immuntitration von verschiedenen Mengen Chloroplastenaldolase von Spinat mit dem Antiserum aus Meerschweinchen gegen dieses Enzym. Die Ordinate gibt den relativen Betrag der freien Enzymaktivität an, die nicht an Antikörper und somit nicht an Staphylococcus aureus Cowan I-Zellen adsorbiert wurden.
 Enzym: $2,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$; x unverdünn;
 Δ 1:2 verdünnt; ▲ 1:4 verdünnt; □ 1:8 verdünnt;
 ■ 1:16 verdünnt.

Die gleiche Korrelation wurde erhalten, wenn die Enzymaktivitäten bei verschiedenen, aber konstanten Serumkonzentrationen variiert wurden. Die Abb. 14 zeigt die Titrationskurven für einen Verdünnungsbereich des Antiserums von 1 : 1 bis 1 : 8.

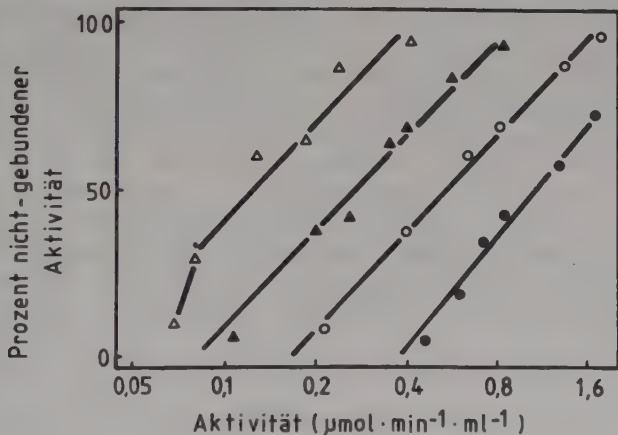


Abb. 14: Immuntitration von Antiserum gegen die Chloroplastenaldolase in 4 Verdünnungsstufen mit der Chloroplastenaldolase (Abszisse) in einer Aktivität von $2,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$. Antiserum Δ unverdünnt; $\blacktriangle$ 1 : 2 verdünnt; $\circ$ 1 : 4 verdünnt; $\bullet$ 1 : 8 verdünnt.

Diese beiden Versuche demonstrieren also, daß die Menge an Enzym mit Antiserum quantitativ verrechnet werden kann, indem die Enzym- bzw. Serumverdünnungen bei einem bestimmten Prozentsatz der nicht-gebundenen Enzymaktivität, vorzugsweise bei 50 %, bestimmt werden.

Da der Immuntitrationstest mit Staphylococcus aureus-Zellen auf der Messung der Enzymaktivität beruht und

die Menge an Protein des Antigens nicht erfaßt wird, sollte noch in einem zweiten Versuch untersucht werden, inwieweit inaktives Enzym einen Einfluß auf die Immuntitration hat. Hierzu wurde in 2 Ansätzen eine Immuntitration mit derselben Menge an aktivem Enzym durchgeführt und zu einem Ansatz Enzym zugegeben, das durch einstündige Inkubation bei 60°C inaktiviert wurde. Das Experiment wurde mit Chloroplastenaldolase aus Spinatblättern und dem komplementären Antiserum aus Meerschweinchen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 15 dargestellt. Die beiden Titrationskurven sind nahezu identisch. Das inaktive Enzym konkurrierte also nicht mit dem aktiven Enzym um die Reaktion mit den Antikörpern.

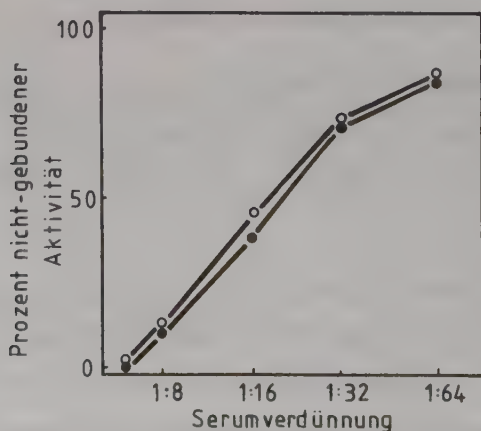


Abb. 15: Immuntitration mit Staphylococcus aureus-Zellen von aktiver (●) und aktiver plus inaktivierter (○) Chloroplastenaldolase aus Spinat mit dem Antiserum gegen die Chloroplastenaldolase.

Nun wurde zunächst die Kreuzreaktion der beiden Aldolase-Isoenzyme aus Spinat mit Hilfe des Doppeldiffusionstests nach Ouchterlony und des Immuntitrationstests ermittelt. In Abb. 15 ist das Ergebnis des Doppeldiffusionstests nach Ouchterlony mit verschiedenen Antiseren dargestellt. Das Meerschweinchen-Antiserum gegen die cytosolische Aldolase aus Spinat reagiert nur mit dem komplementären Antigen, nicht jedoch mit den Aldolasen aus Mais und Spinatchloroplasten (Abb. 16 A). Das Kaninchen-Antiserum gegen die Chloroplastenaldolase aus Spinat bildet Präzipitationsbanden mit dem komplementären Antigen und mit der Aldolase aus Mais, aber nicht mit der cytosolischen Aldolase aus Spinat (Abb. 16 B). Die Antisera zweier weiterer Meerschweinchen, die mit derselben Menge und zu denselben Zeiten mit der Chloroplastenaldolase aus Spinatblättern immunisiert worden waren, zeigten unterschiedliche Reaktionen. Mit dem komplementären Antigen reagieren beide Seren sehr gut. Eine deutliche Präzipitationsreaktion mit der cytosolischen Aldolase aus Spinat tritt nur bei dem einen Serum auf (Abb. 16 C), während das andere nicht mit dieser Aldolase reagierte (Abb. 16 D). Diese Ergebnisse implizieren eine zwar unterschiedliche, im allgemeinen aber eher geringe Kreuzreaktion zwischen den beiden Spinat-Aldolasen.

Die Immuntitrationsteste mit Staphylococcus aureus-Zellen wurden mit denselben Antiseren und Antigenen durchgeführt wie die Doppeldiffusionstests nach Ouchterlony. Die Ergeb-

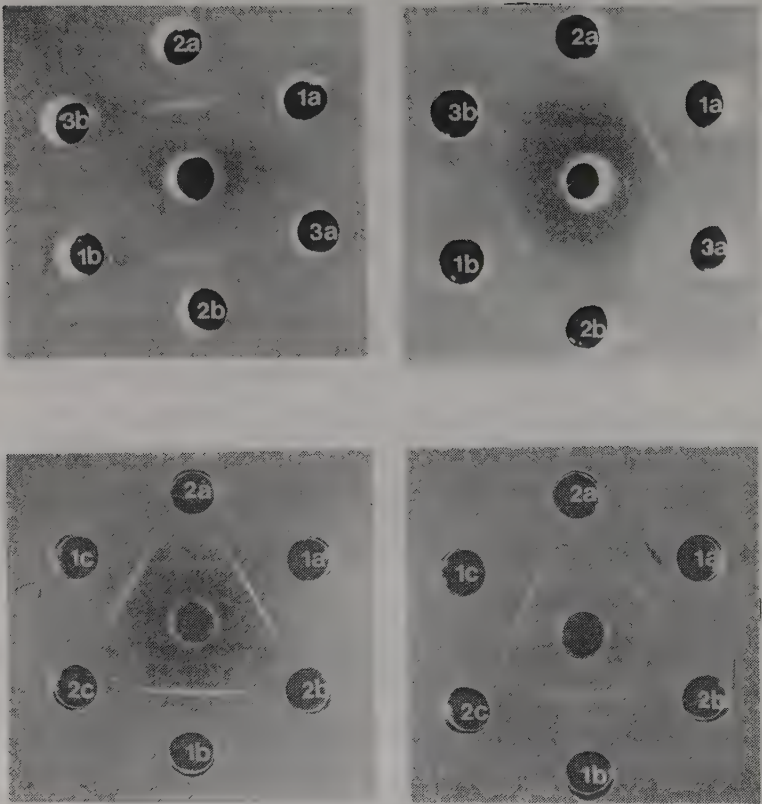


Abb. 16: Doppeldiffusionstests nach Ouchterlony mit Meerschweinchen-Antiserum gegen die cytosolische Aldolase aus Spinat (A), mit Kaninchen-Antiserum gegen die Chloroplastenaldolase aus Spinat (B) und mit 2 Antiseren gegen die Chloroplastenaldolase aus Spinat von Meerschweinchen, die nach demselben Immunisierungsplan und mit denselben Mengen an Antigen immunisiert worden sind (C und D). In die mittleren Depots wurden die Antiseren gegeben, in die äußeren die Antigene. 1a, 1b, 1c: 10;5 bzw. 2,5 μ g Chloroplastenaldolase aus Spinat; 2a, 2b, 2c: 10;5 bzw. 2,5 μ g cytosolische Aldolase aus Spinat; 3a und 3b: 10 bzw. 5 μ g Aldolase aus Maisblättern.

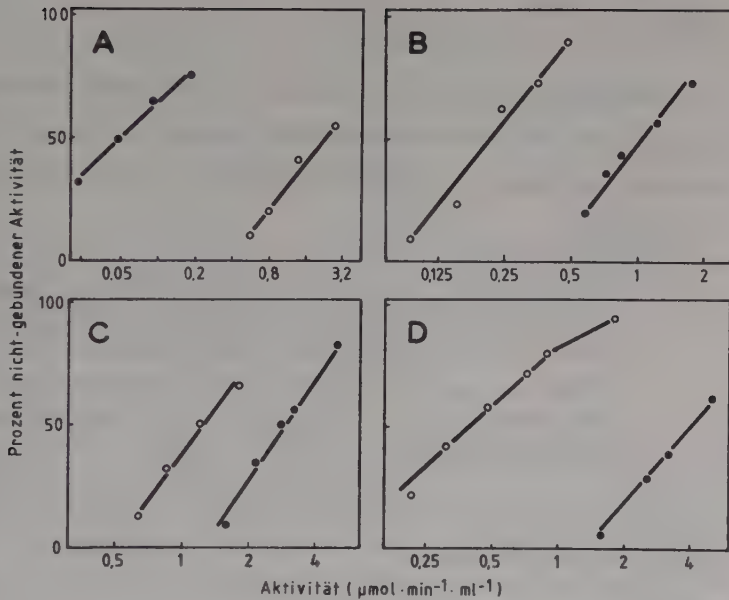


Abb. 17 Immuntitrationsteste mit konstanter Serumkonzentration und verschiedenen Enzymmengen, ausgedrückt in Enzymaktivitäten (Abszisse). Die Experimente wurden mit Meerschweinchenantiseren gegen die cytosolische Aldolase (A) und gegen die Chloroplastenaldolase (B) mit Aldolasen aus dem Cytosol (o) und Chloroplasten (●) aus Spinat durchgeführt.

nisse sind in Abb. 17 gezeigt. Die Titrationskurven verlaufen alle nahezu parallel. Die Kreuzreaktion zwischen den Isoenzymen wird nun quantitativ bestimmt, indem der Quotient der Enzymaktivitäten, bei denen 50 % der Aktivität als Immunkomplexe mit Staphylococcus aureus Cowan I-Zellen abzentrifugiert wurde, gebildet und in Prozent ausgedrückt wird. Die Aktivität des

Enzyms, gegen das das betreffende Antiserum hergestellt wurde, steht dabei im Nenner.

Die immunchemischen Kreuzreaktionen zwischen der Chloroplasten- und der cytosolischen Aldolase aus Spinat, die mit diversen Antiseren erhalten wurden, sind in Tab. 5 zusammengefaßt.

Tab. 5: Werte für Prozent Kreuzreaktion zwischen Chloroplasten- und cytosolischer Aldolase aus Spinatblättern, die mit verschiedenen Antiseren durch Immuntitration mit Staphylococcus aureus-Zellen ermittelt wurden.

Antiserum gegen die Chloroplastenaldolase aus	Kreuzreaktion
Kaninchen (erste Blutentnahme)	12 %
Kaninchen (zweite Blutentnahme)	20 %
Meerschweinchen 1 ⁺	47 %
Meerschweinchen 2 ⁺	11 %
Antiserum gegen die cytosolische Aldolase aus	
Meerschweinchen 3 (erste Blutentnahme)	4 %
Meerschweinchen 3 (zweite Blutentnahme)	45 %

⁺ Dasselbe Immunogen und derselbe Immunisierungsplan

Aus Tab. 5 geht hervor, daß die Kreuzreaktion der beiden Aldolasen aus Spinat von Antiserum zu Antiserum verschieden ist. Dabei reagieren auch die Antiseren aus einem Tier unterschiedlich, wenn sie zu verschiedenen Zeiten gewonnen

werden (12 % und 20 % bei dem Kaninchen-Antiserum bzw. 4 % und 45 % bei Meerschweinchen 2-Antiserum). Sie reagieren u.a. auch sehr unterschiedlich, wenn dasselbe Immunogen und derselbe Immunisierungsplan appliziert wird (47 % und 11 % bei Meerschweinchen 1 und 2).

Die Werte demonstrieren den Vorteil des quantitativen Immuntitrationstests mit Staphylococcus aureus-Zellen gegenüber dem mehr qualitativen Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony.

Um nun auch strukturelle Unterschiede von Aldolasen aus verschiedenen Pflanzen erfassen zu können, wurden ebenfalls der Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony und die Immuntitration mit Staphylococcus aureus-Zellen angewendet. Die Abb. 18 zeigt, daß alle untersuchten Aldolasen mit dem Meerschweinchen-Antiserum gegen die Chloroplastenaldolase aus Spinat Präzipitationsbanden bildeten. Die cytosolische Aldolase aus Spinat reagierte jedoch nur sehr schwach. Darüber hinaus trat immer ein Sporn von der benachbarten Aldolase zum Depot der cytosolischen Aldolase aus Spinat auf (Abb. 18 A, C und D). Schwach ausgebildete Sporne traten auch jeweils zum Farnenzym hin auf zwischen den Aldolasen aus Spinat-chloroplasten und Dryopteris filix-mas sowie zwischen den Aldolasen aus Portulaca oleracea und Dryopteris filix-mas. Bei den übrigen Aldolasen waren keine Sporne sichtbar (Abb. 18 A bis D).

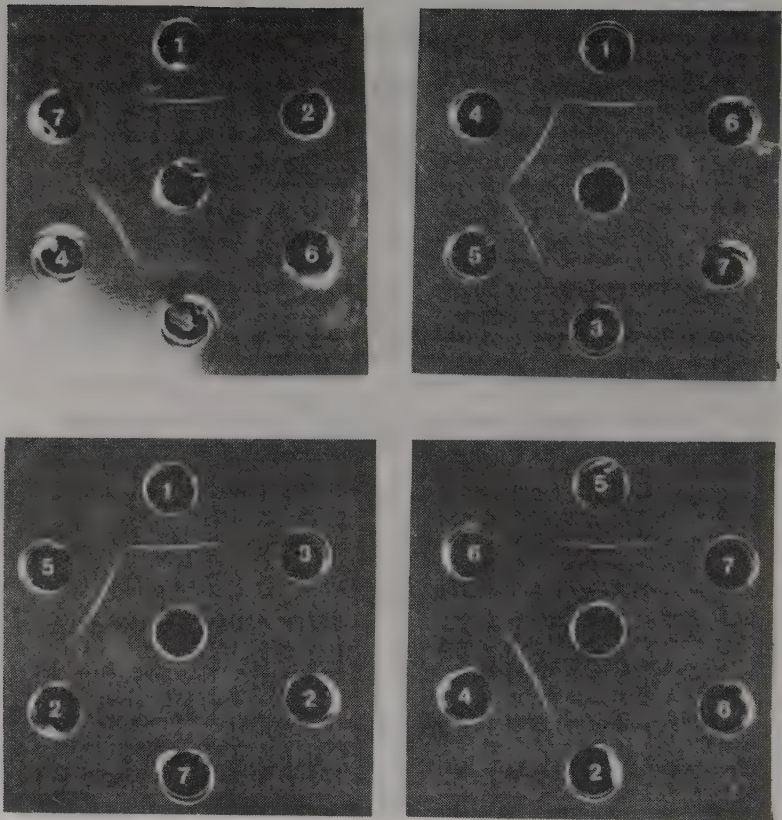


Abb. 18: Doppeldiffusionstests nach Ouchterlony mit einem Antiserum aus Meerschweinchen gegen die Chloroplastenaldolase aus Spinat in den mittleren Depots und Aldolasen aus verschiedenen Pflanzen in den äußeren Depots.
(1) Spinatchloroplasten, 10 μ g; (2) Cytosol, Spinat, μ g; (3) Erbse, μ g; (4) Portulaca oleracea, 10 μ g; (5) Mais, 10 μ g; (6) Dryopteris filix-mas, 10 μ g; (7) Mnium cuspidatum, 8 μ g

Das Meerschweinchen-Antiserum gegen die cytosolische Aldolase aus Spinat ergab mit dem cytosolischen Enzym aus Spinat eine starke und lediglich mit der Aldolase aus Portulaca oleracea eine nur sehr schwache Präzipitationslinie. Es ist nicht auszuschließen, daß hier die kontaminierende cytosolische Aldolase eine Präzipitationsbande verursachte (Abb. 9). Die übrigen Aldolasen reagierten nicht mit diesem Antiserum (Abb. 19).

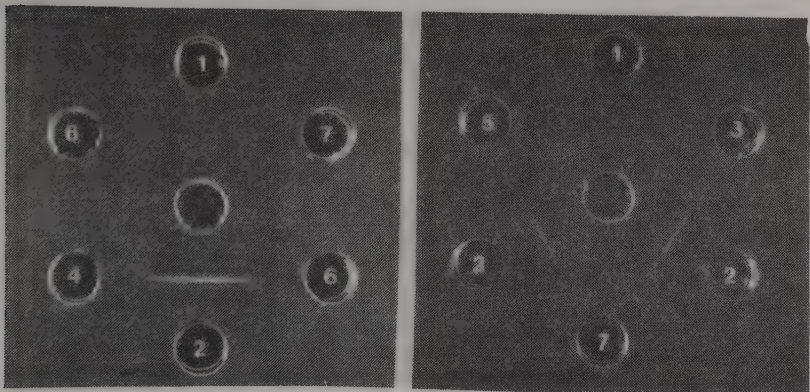


Abb. 19 Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony mit einem Antiserum gegen die cytosolische Aldolase aus Spinat in den mittleren Depots und Aldolasen aus verschiedenen Pflanzen in den äußeren Depots. (1) Spinatchloroplasten, 10 μ g; (2) Spinat, Cytosol, 10 μ g; (3) Erbse, 10 μ g; (4) Portulaca oleracea, 10 μ g; (5) Mais, 10 μ g; (6) Dryopteris filix-mas, 10 μ g; (7) Mnium cuspidatum, 8 μ g.

Die Tests mit beiden Antiseren demonstrieren, daß die Chloroplastenaldolase aus Spinat eindeutig mit den Aldolasen aus den übrigen untersuchten Pflanzen kreuzreagiert und nicht oder nur begrenzt mit der cytosolischen Aldolase aus Spinat.

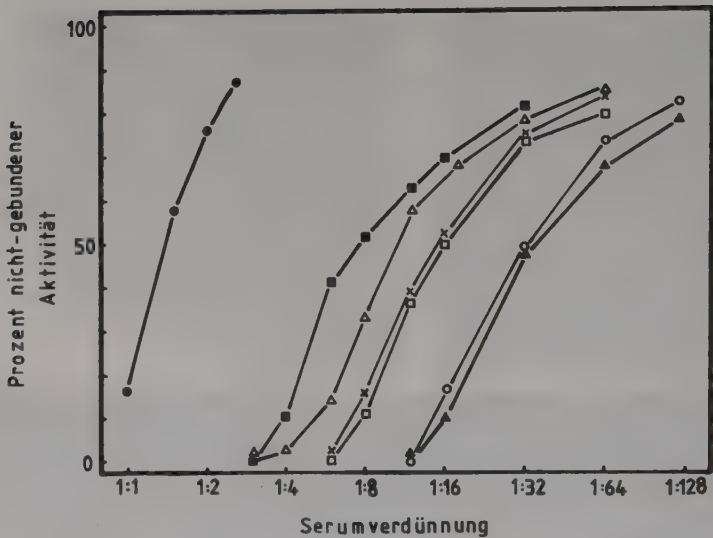


Abb. 20: Immuntitrationstest mit Staphylococcus aureus-Zellen von Aldolasen aus verschiedenen Pflanzen mit einem Meerschweinchenantiserum gegen die Chloroplastenaldolase aus Spinat.
 ○ Spinat, Chloroplasten; ▲ Erbse; □ Dryopteris filix-mas; x Mnium cuspidatum; Δ Portulaca oleracea; ■ Mais; ● Spinat, cytosolische Aldolase.

Die Kreuzreaktion zwischen den Aldolasen aus verschiedenen Pflanzen wurde auch mit Hilfe des Immuntitrations-tests mit Staphylococcus aureus-Zellen durchgeführt. Als Antiserum diente wieder das Meerschweinchen-Antiserum gegen die Chloroplastenaldolase aus Spinat. Die prozentuale Kreuzreaktion wurde auf die Reaktion des Antiserums mit dem komplementären Enzym bezogen. Aus der Abb.20 wird ersichtlich, daß die Aldolase aus Spinatchloroplasten am stärksten mit der Aldolase aus Erbsen kreuz-

reagiert (100 %). Die Aldolase aus Mais kreuzreagierte zu 25 %, aus Portulaca oleracea zu 33 %, aus Mnium cuspidatum und Dryopteris filix-mas zu je 50 % mit der Chloroplastenaldolase aus Spinat. Vergleichsweise kreuzreagiert die cytosolische Aldolase aus Spinat nur zu 5 % mit der Chloroplastenaldolase.

Durch diesen Immuntitrationsversuch wurden die Doppel-diffusionstests nach Ouchterlony im wesentlichen bestätigt. Es zeigt sich, daß die Aldolasen aus anderen Pflanzen in erheblich stärkerem Maße mit der Chloroplastenaldolase aus Spinat kreuzreagieren als die cytosolische Aldolase aus Spinat.

3.8 Peptidkartierung der Aldolasen aus Spinat

Um das Ausmaß über strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Isoenzymen der Aldolasen aus Spinat weiter zu analysieren, sollte eine Fingerprintanalyse der beiden Aldolasen nach partieller Proteolyse durchgeführt werden. Um festzustellen, welche Proteasen die geeignetsten für die Proteinspaltung sind, wurde zunächst die Aminosäurezusammensetzung analysiert. Das Ergebnis der Aminosäureanalyse ist in Tab. 6 dargestellt.

Aus Tab. 6 wird deutlich, daß die Aminosäurezusammensetzung beider Aldolasen aus Spinatblättern nicht sehr unterschiedlich ist. Größere Differenzen treten in der Anzahl von Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Prolin, Valin, Methionin Tyrosin, Lysin und Arginin auf.

Tab. 6: Aminosäurezusammensetzung der Chloroplasten- und cytosolischen Aldolase aus Spinatblättern

Aminosäure	Cytosolische Aldolase	Chloroplasten-aldolase
	mol/mol Enzym	mol/mol Enzym
Asparaginsäure	100	112
Threonin	88	64
Serin	64	88
Glutaminsäure	160	176
Prolin	108	80
Glycin	116	120
Alanin	136	136
Valin	112	96
Methionin	12	20
Isolunin	52	52
Leucin	128	124
Tyrosin	24	32
Phenylalanin	36	32
Histidin	12	16
Lysin	84	72
Arginin	40	56

Aufgrund der Aminosäureanalyse ist zu erwarten, daß bei einer Spaltung der aus 4 identischen Untereinheiten bestehenden Aldolasen mit Trypsin, das nach Lysin und Arginin spaltet, je ca. 35 verschiedene Peptide zu erwarten sind. Die Aldolasen wurden deshalb mit Trypsin gespalten und die Peptide zweidimensional auf Celluloseplatten durch Elektrophorese und Dünnschichtchromatographie getrennt. In Abb. 21 ist das Ergebnis dieser Auftrennung dargestellt. Bei der Spaltung der cytosolischen Aldolase waren 23 Peptide, bei der Chloroplastenaldolase 27 Peptide nachweisbar. Daß nicht die theore-

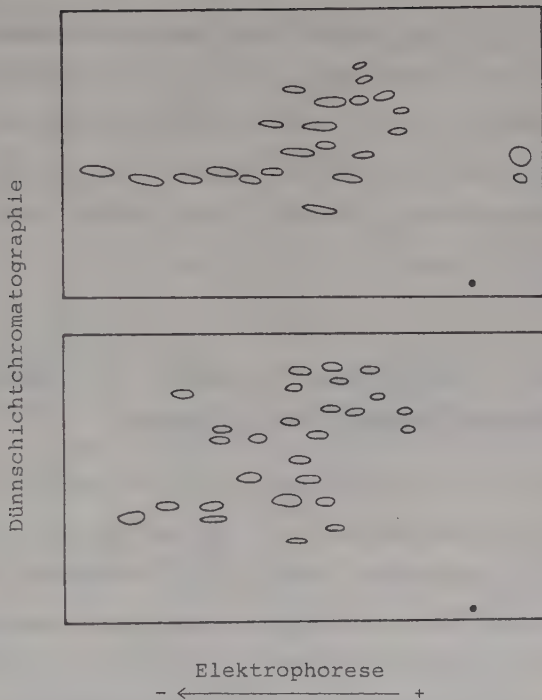


Abb. 2.1: Zweidimensionale Auftrennung der Peptide der cytosolischen (oben) und Chloroplasten-Aldolase (unten) von Spinat nach tryptischer Spaltung. Der schwarze Punkt kennzeichnet die Auftragstelle der Probe. Die Auftrennung erfolgte in der 1. Dimension elektrophoretisch, in der 2. Dimension durch Dünnschichtchromatographie. Die Peptide wurden mit Ninhydrin angefärbt.

tische Anzahl der Peptide zu erkennen war, kann daran liegen, daß Peptide sich überlagern.

Auf der Peptidkarte fallen die beiden negativ geladenen Peptide der cytosolischen Aldolase auf, die nicht bei der Spaltung der Chloroplastenaldolase aufgetreten sind.

Auch die relative Anordnung der übrigen Peptide zueinander sind bei den beiden Isoenzymen verschieden. Bei einer vergleichenden Beurteilung dieses Versuchs kann man feststellen, daß trotz ähnlicher Aminosäurezusammensetzung beider Isoenzyme das gesamte Peptidmuster recht unterschiedlich ist und somit kaum größere identische Aminosäuresequenzen vorliegen können.

3.9 Die Expression der cytosolischen und Chloroplasten-Aldolase in jungen Spinatpflanzen

Im folgenden sollte die Entwicklung der beiden Aldolasen in jungen Spinatpflanzen im Laufe der Keimung untersucht werden. Es wurden dazu Samen sowie Cotyledonen, Primär- und Sekundärblätter vom jungen Spinat zu verschiedenen Zeiten nach Aussaat zur Keimung geerntet und die Aldolaseaktivität, der Chlorophyll- und Proteingehalt sowie die Blattgröße bestimmt. Die Werte wurden alle auf die biologische Einheit "Blatt" bzw. einen halben Samen (da aus einem Samen zwei Cotyledonen wachsen) bezogen und gegen die Zeit nach Aussaat der Samen aufgetragen (Abb. 22). Bei belichteten Cotyledonen stieg die Aldolaseaktivität, der Protein- und Chlorophyllgehalt zunächst parallel mit der Entwicklung der Blattgröße an und fiel nach 4 Wochen wieder leicht ab, während die Blätter noch etwas weiter an Größe zunahmen. Die Blätter fingen nach 4 Wochen an abzusterben. In etiolierten Cotyledonen stieg die Aldolaseaktivität ebenso parallel zur Entwicklung der Blattgröße an, sank jedoch schon nach 10 Tagen wieder langsam ab,

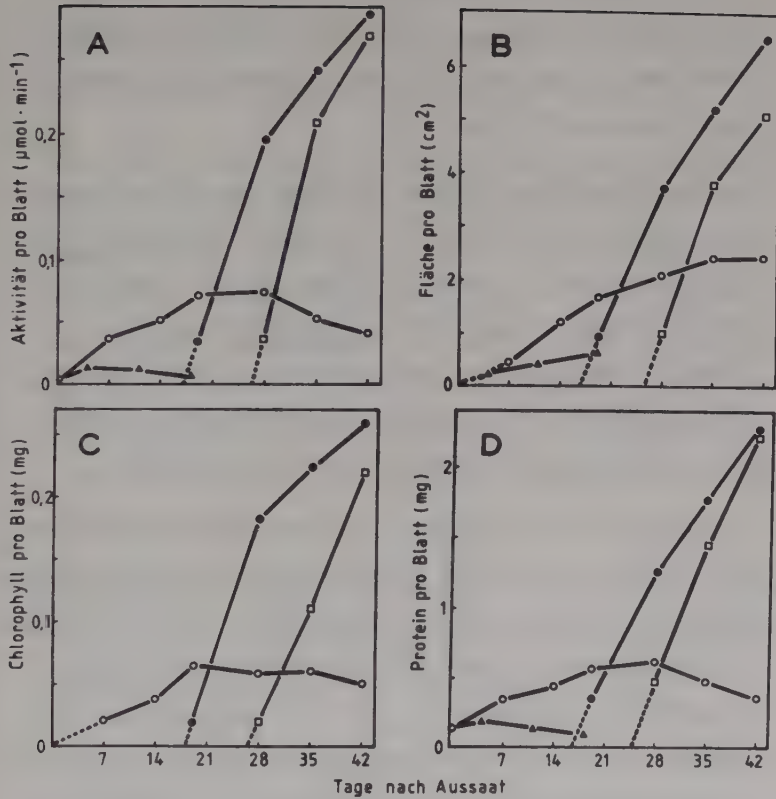


Abb. 22: Die Aldolaseaktivität(A) die Blattfläche(B) der Chlorophyllgehalt(C)und der Proteingehalt(D)in Spinatblättern während der Keimung in Abhängigkeit von der Zeit nach der Aussaat.
 ▲ Etiolierte Cotyledonen; ○ belichtete Cotyledonen; ● Primärblätter; □ Sekundärblätter.

während die Blattgröße konstant blieb. Die Phase des Alterns begann bei etiolierten Cotyledonen schon am 10. Tag. Der Proteingehalt in den etiolierten Cotyledonen war in den ersten 4 Tagen konstant und nahm dann kontinuierlich ab.

Die Ausbildung der Primär- und Sekundärblätter begann ca. 17 bzw. 24 Tage nach der Aussaat. In beiden Blatttypen stieg die Aldolaseaktivität, der Chlorophyll- und Proteingehalt parallel zur Entwicklung der Blattgröße. Es besteht also in wachsenden, grünen Blättern eine Korrelation zwischen Aldolaseaktivität, Chlorophyll- und Proteingehalt sowie der Blattgröße.

In einem weiteren Experiment sollte festgestellt werden, wie groß der Anteil der cytosolischen und Chloroplastenaldolase aus Spinat an der Gesamtaktivität der Aldolase in Cotyledonen, Primär- und Sekundärblättern zu verschiedenen Keimungsstadien ist. Die Proteine der Cotyledonen, Primär- und Sekundärblätter sowie der Samen wurden hierzu durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose aufgetrennt und aufgrund der Aktivität in den zwei Elutionsbereichen der Chloroplasten- und cytosolischen Aldolase die prozentualen Anteile der cytosolischen und Chloroplasten-Aldolase bestimmt (Abb.23).

Die Aldolase der Samen eluierte hauptsächlich bei 0,09 M KCl (Abb. 23 A). Das Elutionsprofil zeigte auch noch eine leichte Schulter bei 0,16 M KCl, wo die Chloroplastenaldolase eluierte. Eine bessere Trennung als in

Abb. 23A konnte nicht erzielt werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß im Samen zum größten Teil das cytosolische Enzym vorhanden ist, während das Chloroplastenenzym nur in geringer Menge vorliegt.

Mit Cotyledonen der etioliierten Keimlinge zeigten die Elutionsprofile jeweils zwei eindeutig getrennte Elutionsbereiche (Abb. 23B, C und D). In den Cotyledonen von 4 und 11 Tagen alten Keimlingen war die Aktivität der Chloroplastenaldolase ca. dreimal so groß wie die der cytosolischen. In den Cotyledonen der 18 Tage alten etioliierten Keimlinge, die schon deutliche Alterungssymptome zeigten, waren die Aktivitäten beider Isoenzyme beinahe gleich groß.

Die belichteten grünen Cotyledonen, Primär- und Sekundärblätter zeigten ein weitgehend identisches Verteilungsprofil der Aldolase. Die cytosolische Aldolase eluierte bei etwa 0,08 M KCl, die Chloroplastenaldolase bei 0,15 M KCl (Abb. 23 E bis S). Die Chloroplastenaldolase repräsentierte den Hauptteil der gesamten Aldolase.

In Abb. 24 ist der prozentuale Anteil der beiden Aldolase-Isoenzyme in Samen, etioliierten und belichteten Cotyledonen, Primär- und Sekundärblättern von Spinat zu verschiedenen Entwicklungsstadien in einem Stabdiagramm zusammengefaßt. In ungekeimten Samen ist fast ausschließlich cytosolische Aldolase vorhanden, was durch nicht geschlossene Balken im Diagramm kenntlich gemacht ist. In etioliierten Cotyledonen beträgt der Anteil der Chloro-

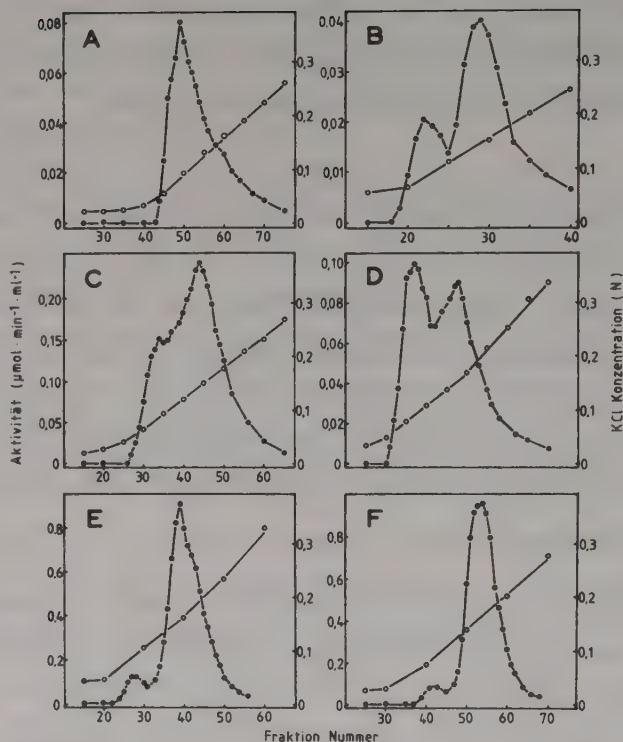


Abb. 23: Chromatographie von Aldolasen aus ungekeimten Samen, Cotyledonen, Primär- und Sekundärblättern zu verschiedenen Entwicklungsstadien an DEAE-Cellulose.
A Samen; B etiolierte Cotyledonen, 4 Tage nach Aussaat; C etiolierte Cotyledonen, 11 Tage nach Aussaat; D etiolierte Cotyledonen, 18 Tage nach Aussaat; E belichtete Cotyledonen, 7 Tage nach Aussaat; F belichtete Cotyledonen, 14 Tage nach Aussaat;

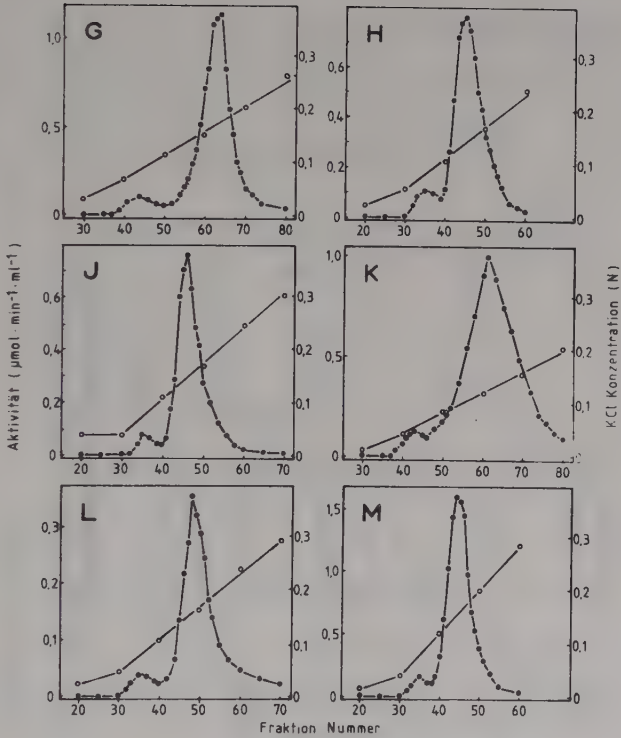


Abb. 2.3 (Fortsetzung):

G belichtete Cotyledonen, 21 Tage nach Aussaat;
H belichtete Cotyledonen, 28 Tage nach Aussaat;
J belichtete Cotyledonen, 35 Tage nach Aussaat;
K belichtete Cotyledonen, 42 Tage nach Aussaat;
L Primärblätter, 14 Tage nach Aussaat;
M Primärblätter, 21 Tage nach Aussaat;

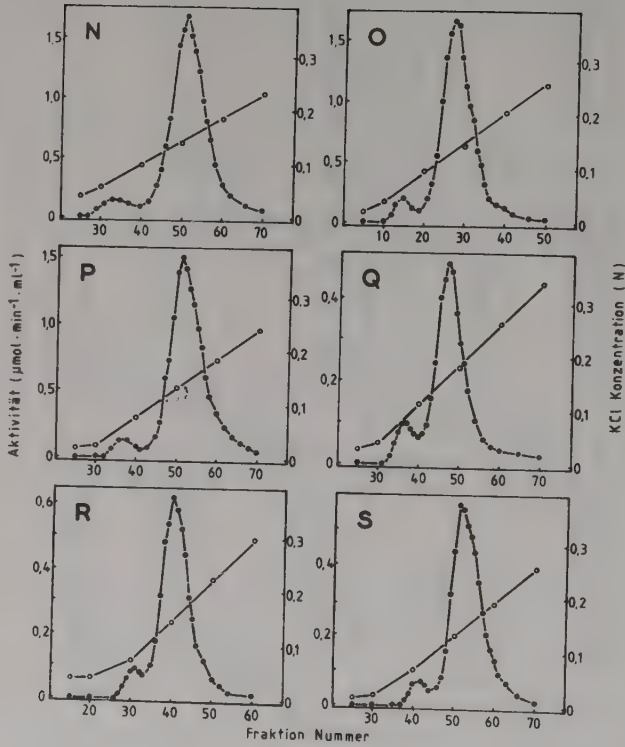


Abb. 23 (Fortsetzung):

N Primärblätter, 28 Tage nach Aussaat;
 O Primärblätter, 35 Tage nach Aussaat;
 P Primärblätter, 42 Tage nach Aussaat;
 Q Sekundärblätter, 28 Tage nach Aussaat;
 R Sekundärblätter, 35 Tage nach Aussaat;
 S Sekundärblätter, 42 Tage nach Aussaat.

plastenaldolase bereits nach 4 Tagen 75 % und fällt in alten etioliierten Cotyledonen 18 Tage nach der Keimung auf 50 %, während die cytosolische Aldolase von 25 % auf 50 % ansteigt. In allen grünen Blättern (Cotyledonen, Primär- und Sekundärblättern) repräsentiert die Chloroplastenaldolase 90 bis 94 %, die cytosolische Aldolase nur 6 bis 10 % der Gesamtaktivität.

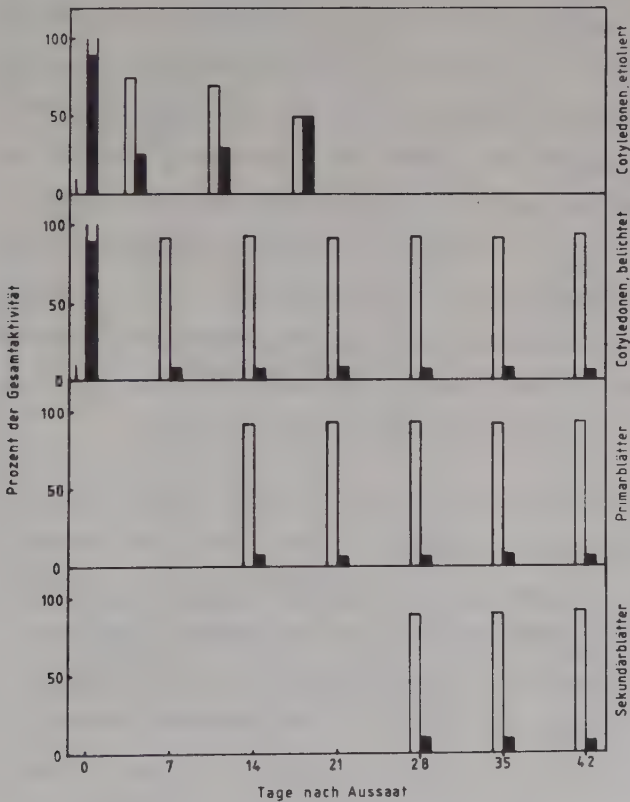


Abb. 24: Prozentuale Verteilung der Aldolase-Isoenzyme in Samen und etioliierten und grünen Cotyledonen, Primär- und Sekundärblättern von Spinat zu verschiedenen Entwicklungsstadien. Schwarze Balken: cytosolische Aldolase; weiße Balken: Chloroplastenaldolase.

Die am stärksten vertretene Aldolase aus Samen scheint die cytosolische Aldolase zu sein, da sie bei 0,09 M KCl eluierte (s.o.). Eine Reinigung dieses Enzyms durch Affinitätschromatographie an Cellulosephosphat und eine anschließende Analyse durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese resultierte in nur einer Proteinbande (Abb. 25). Diese war jedoch im mittleren Bereich der Bande schneller laufend als die der cytosolischen Aldolase aus Spinatblättern. Allerdings tendierten die Enden der Bande der Samenaldolase langsamer zu laufen und mit der cytosolischen Aldolase, nicht aber mit der Chloroplastenalldolase in benachbarten Spuren zu fusionieren, was bei der cytosolischen und Chloroplasten-Aldolase aus grünen Blättern nie zu beobachten ist. Dieses Verhalten läßt auf eine Homologie der Samenaldolase mit der cytosolischen Aldolase aus grünen Blättern schließen. Allerdings scheinen hier noch zusätzliche unbekannte Modifikationen zwischen den beiden Aldolasen vorzuliegen.

Die Aldolase aus Samen wurde weiterhin immunchemisch auf ihre Kreuzreaktion mit der cytosolischen und Chloroplasten-Aldolase aus grünen Spinatblättern untersucht. Als Seren wurden Meerschweinchen-Antiseren gegen die Chloroplasten- und cytosolische Aldolase aus Spinatblättern verwendet. In Tab. 7 sind die prozentualen Anteile der Aktivitäten, die an Antikörper der beiden Antiseren gebunden wurden, für die drei Enzyme dargestellt. Es wird daraus deutlich, daß die Samenaldolase nur wenig mit den Isoenzymen aus dem Cytosol und den Chloroplasten

kreuzreagiert. Dieser Versuch läßt den Schluß zu, daß die Aldolase aus Spinatsamen sich strukturell, evtl. durch Modifikationen, von den beiden Isoenzymen aus den Blättern unterscheidet. Ob es sich hierbei um eine weitere, in der Primärstruktur unterschiedliche oder nur durch posttranslationale Modifikation veränderte cytosolische Aldolase handelt, muß offengelassen werden.

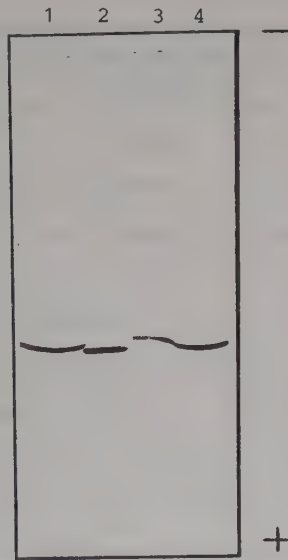


Abb. 25: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von der Aldolase aus Samen (Spur 1 und 4) sowie aus Chloroplasten (Spur 2) und aus dem Cytosol (Spur 3) grüner Folgeblätter von Spinat. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue R 250 angefärbt.

Tab. 7 : Immunchemischer Vergleich der Chloroplasten-, cytosolischen und Samen-Aldolase aus Spinat mit Meerschweinchen-Antiseren gegen die Chloroplasten- und cytosolische Aldolase. Antigen-Antikörper-Komplexe wurden an Staphylococcus aureus-Zellen adsorbiert und abzentrifugiert. Der prozentuale Anteil der gebundenen Aktivität wurde bestimmt durch Messen der verbliebenen freien Aktivität im Überstand. Bei allen Experimenten wurde $0,14 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ an Aktivität (= 100 %) eingesetzt.

Aldolase aus	Antiserum gegen die Aldolase aus	
	Chloroplasten	Cytosol
Chloroplasten	100 %	60 %
Cytosol	17 %	94 %
Samen	15 %	33 %

4. Diskussion

Die Aldolase liegt in den Pflanzen in Form von zwei Isoenzymen vor, die spezifisch im Cytosol und in den Chloroplasten einer Zelle lokalisiert sind. Dies wurde bereits für die Aldolasen aus grünen Erbsenblättern (Anderson, 1970; Anderson und Pacold, 1972), sich entwickelndem Ricinusendosperm (Simcox und Dennis, 1978), Endosperm von keimenden Ricinussamen (Nishimura und Beevers, 1981) sowie Maisblättern (Gasperini und Pupillo, 1982) gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde dies für die Aldolase aus Spinatblättern bestätigt.

Um die Isoenzyme der Aldolasen auf molekularer Ebene strukturell miteinander vergleichen zu können, ist es unabdingbar, die beiden Isoenzyme eindeutig zu trennen und bis zur Homogenität zu reinigen. Für Strukturuntersuchungen der Isoenzyme sind dabei größere Mengen an Protein nötig; das ist in der Größenordnung von mehreren Milligrammen. Die frühere Trennung der beiden Aldolase-Isoenzyme aus grünen Blättern von Erbsen erfolgte durch isoelektrisches Fokussieren nach Cytosol- und Chloroplastenpräparationen (Anderson und Advani, 1970; Anderson et al., 1975). Diese Methode hat den Nachteil, daß die Ausbeuten der Isoenzyme gering waren und nur kleinere Gewebemengen aufgearbeitet werden konnten. Andere Versuche, die Aldolase-Isoenzyme aus grünen Blättern von Mais zu trennen, waren ebenfalls unbefriedigend, da die Trennung nur wenig praktikabel war (Gasperini und Pupillo, 1982). Eine den oben genannten Ansprüchen gerecht werdende Trennung

der beiden Aldolase-Isoenzyme konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose und durch Verwendung von Spinatblättern erreicht werden. Die Trennungen waren eindeutig und leicht zu bewerkstelligen. Die Ausbeuten in Präparationen, in denen bis zu 1 kg Spinatblätter aufgearbeitet werden konnten, lag bei 70 %. Aldolase-Isoenzyme aus anderen Geweben wie Blättern von Erbsen, Mais, Portulaca oleracea und Dryopteris filix-mas sowie aus Mnium cuspidatum ließen sich allerdings nicht mit dieser Methode trennen. Offensichtlich haben die beiden Aldolasen aus Spinat im Gegensatz zu den beiden Isoenzymen aus anderen Pflanzen eine besonders günstige Elutionseigenschaft für eine gute Trennung. Der Grund hierfür ist unbekannt.

Das Verhältnis der Aktivitäten der beiden Aldolase-Isoenzyme in Spinatblättern nach Trennung an DEAE-Cellulose impliziert, daß ca. 8 % der gesamten Aldolaseaktivität in dem Cytosol und ca. 92 % in den Chloroplasten der Zellen lokalisiert ist. Der Wert von 65 % für den Anteil der Chloroplastenaldolase an der Gesamtaktivität in Spinatblättern durch Vergleich der spezifischen Aktivitäten in Rohextrakten und in isolierten Chloroplasten erscheint nach meinen eigenen Befunden noch erheblich zu gering (Latzko und Gibbs, 1968). In Zellen von Weizenblättern beträgt der Anteil der cytosolischen Aldolase ca. 10 % und der der Chloroplastenaldolase ca. 90 %, wie von Murphy und Walker (1981) nach demselben Prinzip ermittelt wurde. In Maisblättern liegt der Anteil der

cytosolischen Aldolase zwischen 6 % und 11 %, der der Chloroplastenaldolase zwischen 89 % und 94 % nach Trennung der Isoenzyme an DEAE-Cellulose (Gasperini und Pupillo, 1982). Diese Ergebnisse zeigen, daß sicher der größte Teil der Aldolasen aus grünen Blättern in den Chloroplasten lokalisiert ist.

Bei der weiteren Reinigung erwies sich die Affinitätschromatographie an Cellulosephosphat (Heil und Lebherz, 1978) für beide Aldolasen als sehr geeignet, da sie in vielen Präparationen bereits zu homogenen Proteinen führte. Als ein kritischster Faktor bei diesem Schritt erwies sich der pH-Wert zur Bindung der Aldolase an das Cellulosephosphat. Die cytosolische Aldolase konnte stets gut in 10 mM Tris/HCl bei pH 7,3 gebunden werden. Bei der Chloroplastenaldolase zeigte sich ein pH-Wert von 6,5 mit 10 mM Imidazol als vorteilhafter, da bei pH-Werten geringfügig größer als 7,3 nur ganz geringe Bindung an Cellulosephosphat erfolgte. Bei der Reinigung der Chloroplastenaldolase war auch manchmal anschließend eine Ultrazentrifugation im Saccharosegradienten notwendig, um noch leichte Verunreinigungen durch andere Proteine, vornehmlich der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase, zu entfernen. Es war auf diese Art möglich, die beiden Aldolasen aus Spinat und Aldolasen aus Erbsen, Mais, Portulaca oleracea, Dryopteris filix-mas und Mnium cuspidatum in zwei bis drei Reinigungsschritten bis zur Homogenität zu reinigen. Die spezifischen Aktivitäten für die gereinigte cytosolische und Chloroplastenaldolase aus Spinat

betragen 7,2 und 7,8 units $\cdot$ (mg Protein) $^{-1}$ und für die Aldolasen aus Blättern von Erbsen, Mais, Portulaca oleracea und Dryopteris filix-mas sowie aus Mnium cuspidatum betrugen die spezifischen Aktivitäten 7,7; 3,3; 1,25; 4,4 und 2,9 units $\cdot$ (mg Protein) $^{-1}$. Sie lagen damit im Bereich der Werte von 2 und 44 units $\cdot$ (mg Protein) $^{-1}$, die früher für gereinigte Aldolasen aus Spinat- und Erbsenblättern angegeben wurden (Anderson et al., 1975; Brooks und Criddle, 1966; Fluri et al., 1967; Heil und Lebherz, 1978). Es ist unklar, ob die etwas differierenden spezifischen Aktivitäten möglicherweise durch unterschiedliche Inaktivierung bei der Präparation hervorgerufen wurden oder ob die Proteine von Natur aus eine etwas unterschiedliche spezifische Aktivität besitzen.

Die beiden Aldolasen aus Spinat und die Aldolasen aus den anderen Pflanzen hatten identische Abhängigkeiten in ihrer Aktivität der Fructose-1,6-bisphosphatspaltung vom pH-Wert. Sie zeigten alle ein breites Optimum bei pH 7,5. Für die Cytosol- und Chloroplastenaldolasen ließen sich hierbei keine Unterschiede ableiten.

Der K_m -Wert der cytosolischen Aldolase aus Spinatblättern für Fructose 1,6-bisphosphat lag bei 2,4 μ M, derjenige der Chloroplastenaldolase bei 10 μ M. Die Aldolasen aus Erbsen, Mais, Portulaca oleracea, Dryopteris filix-mas und Mnium cuspidatum besaßen K_m -Werte zwischen 7 und 10,5 μ M. Dies mag als Hinweis gelten, daß es sich um Chloroplastenaldolasen handelte. Vergleichsweise wurden früher K_m -Werte von 21 μ M und 19 μ M für die cytosolische

bzw. Chloroplastenaldolase aus Erbsenblättern ermittelt (Anderson und Pacold, 1972), von 20 μM für die Aldolase aus Spinatblättern (Fluri et al., 1967) und von 68 μM für die Chloroplastenaldolase aus Spinat (Brooks und Criddle, 1966). Der K_m -Wert von 0,3 μM für die Aldolase aus Maisblättern (Gasperini und Pupillo, 1983) erscheint mir dagegen erheblich zu niedrig.

Die K_m -Werte der cytosolischen und Chloroplastenaldolase aus Spinatblättern für Glycerinaldehyd-3-phosphat waren mit 32 μM bzw. 91 μM ähnlich unterschiedlich wie für Fructose 1,6-bisphosphat. Beide Enzyme wurden durch hohe Dihydroxyacetonphosphat-Konzentrationen gehemmt. Die Befunde über eine 3-fach höhere Affinität der cytosolischen gegenüber der Chloroplastenaldolase deuten auf gewisse Aminosäure-Unterschiede im Bereich des aktiven Zentrums der Enzyme hin. Von mehreren Isoenzympaaren des Zuckerphosphat-Stoffwechsels sind die katalytischen Eigenschaften untersucht und verglichen worden. Dabei scheint es 2 Gruppen von Isoenzympaaren zu geben. Bei der einen Gruppe sind die katalytischen Eigenschaften (pH-Abhängigkeit, Affinität zu Substraten, Ionenabhängigkeit, Regulation durch Effektoren usw.) weitgehend ähnlich. Hierzu gehören u.a. die Isoenzyme der Phosphorylase, Phosphoglucomutase, Glucose-6-phosphat Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat Dehydrogenase, Triosephosphat Isomerase, 3-Phosphoglycerat Kinase und die Aldolase. Bei der anderen Gruppe gibt es dagegen einige größere Unterschiede in den katalytischen Eigenschaften. So zeigt die Glycerinaldehyd-phosphat

Dehydrogenase aus Chloroplasten höherer Pflanzen NADP^+ - und NAD^+ -Spezifität, wobei die Affinität zu NADP^+ aber bedeutend größer ist als für NAD^+ , während das cytosolische Enzym hingegen nur NAD^+ als Cosubstrat verwendet (Cerff, 1978; Cerff und Chambers, 1979). Die Isoenzyme der Fructose-1,6-bisphosphatase aus dem Cytosol und aus Chloroplasten von Spinat unterscheiden sich stark in ihrer Affinität zu Fructose 1,6-bisphosphat, ihrer Hemmung durch Fructose 2,6-bisphosphat, ihrer pH- und Mg^{2+} -Abhängigkeit (Zimmermann et al., 1976; 1978; Cseke et al., 1982). Die Phosphofructokinase-Isoenzyme werden unterschiedlich durch anorganisches Phosphat reguliert (Kelly und Latzko, 1977). Ferner ist in den Chloroplasten von Spinat ADP-Glucose-Phosphorylase, während im Cytosol die UDP-Glucose-Phosphorylase lokalisiert ist (Mares et al., 1978).

Um die Aldolasen strukturell miteinander vergleichen zu können, wurden zunächst die relativen Molekülmassen bestimmt. Die relativen Molekülmassen der nativen Enzyme, ermittelt durch Zentrifugation im Saccharosegradienten nach der Methode von Martin und Ames (1961), betrugen 143 000 bzw. 148 000 für die Cytosol- bzw. Chloroplastenaldolase. Da jedoch die Sedimentationsgeschwindigkeit der Proteine nicht nur von ihrer Größe, sondern auch von ihrer Form abhängt, können diese Werte nur als ungefähre Größen angesehen werden. Anhand einer SDS-Gelelektrophorese wurde gezeigt, daß die cytosolische und Chloroplastenaldolase aus Spinat aus jeweils 4 identischen Untereinheiten mit relativen Molekülmassen von 38 000

bzw. 35 000 besteht. Die Untereinheiten der Aldolasen aus Erbsen, Mais, Portulaca oleracea, Dryopteris filix-mas und Mnium cuspidatum haben dieselbe relative Molekülmasse von 35 000 wie die Chloroplastenaldolase aus Spinat. Dies deutet, wie einige noch später zu erwähnende Befunde, darauf hin, daß es sich um Chloroplastenenzyme handelt. Fluri et al. (1967) haben eine relative Molekülmasse von 120 000 für Spinataldolasen ermittelt, Brooks und Criddle (1966) eine von 142 000 für die Aldolase aus Spinatchloroplasten. Die relativen Molekülmassen der Aldolase-Isoenzyme aus Weizenblättern betragen beide 142 000 (Murphy und Walker, 1981), die der cytosolischen und Chloroplastenaldolasen aus Maisblättern betragen 160 000 (Gasperini und Pupillo, 1982) und die aus Erbsenblättern 148 000 (Anderson et al., 1975). Es konnte also nur bei den beiden Isoenzymen aus Spinatblättern ein Unterschied in den relativen Molekülmassen nachgewiesen werden. Die Differenz von 3 000 bei den Untereinheiten der Isoenzyme aus Spinat entspricht ca. 30 Aminosäuren. Dabei ist es unklar, ob diese am Ende der Peptide oder über das gesamte Peptid verstreut vorkommen.

Um strukturelle Unterschiede oder Homologie zwischen Proteinen weiter zu klären, stehen u.a. immunologische Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Für solche Analysen sind Antikörper notwendig, die spezifisch mit den zu untersuchenden Proteinen reagieren. Vergleicht man nun die Reaktion der Antikörper zum einen mit den komplementären Proteinen, d.h. mit Proteinen gegen die die Antikörper hergestellt wurden, und

zum anderen mit strukturell ähnlichen Proteinen, kann man Unterschiede in der Struktur und damit in der Aminosäuresequenz von Proteinen erfassen, da die Reaktion von Antikörpern mit einem Antigen im allgemeinen proportional zur Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz dieser Antigene mit dem komplementären Antigen ist (Prager und Wilson, 1971; Wallace und Boulter, 1967; Hurrell et al., 1977).

Unter den vielen qualitativen und quantitativen immunochemischen Methoden wurde der Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony und ein in unserem Labor entwickelter Immuntitrationstest benutzt, um die pflanzlichen Aldolasen strukturell miteinander zu vergleichen. Der Doppeldiffusionstest ist sehr einfach in der Durchführung, aber er ermöglicht nur qualitative Aussagen über die Antigen-Antikörper-Reaktion. Mit Hilfe des Immuntitrationstests mit Staphylococcus aureus hingegen lassen sich Kreuzreaktionen durch Vergleich mit der "Selbstreaktion" quantitativ bestimmen. Der Vorteil dieses Tests gegenüber anderen immunochemischen Tests wie ELISA, Immunpräzipitationstest oder Immunelektrophorese, die ebenfalls die Antigen-Antikörper-Reaktion quantitativ erfassen, liegt einmal darin, daß dieser Test in viel kürzerer Zeit durchgeführt werden kann. Ferner besitzt dieser Test eine hohe Spezifität, so daß nicht einmal reine Antigene und monospezifische Antikörper erforderlich sind, da der Test auf der Messung der Enzymaktivität des Antigens beruht und nicht wie bei den anderen Tests nur auf der Bestimmung der unspezifischen Protein-Protein-Interaktion. Der immunochemische

Vergleich der beiden Aldolase-Isoenzyme aus Spinat erbrachte sowohl mit dem Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony als auch mit dem Immuntitrationstest mit Staphylococcus aureus eine nur relativ schwache Kreuzreaktion. Das Ergebnis impliziert auf der einen Seite gravierende strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Enzymen, auf der anderen Seite aber auch gewisse Gemeinsamkeiten. Wenn man bei der Bewertung der Befunde zugrunde legt, daß die nativen Proteine der beiden Aldolasen mit einer relativen Molekülmasse von 140 000 bis 150 000 in Analogie zu vergleichbar großen Proteinen mehrere Determinanten besitzen, so kann man weiter postulieren, daß sich die strukturellen Unterschiede auf die gesamte Aminosäuresequenz erstrecken müssen und nicht etwa, wie oben bei der Diskussion über die relativen Molekülmassen als Möglichkeit angedeutet, nur auf einige terminale Aminosäuren beschränkt sind.

Die Ergebnisse mit diversen Antiseren waren recht unterschiedlich. Insgesamt lag die Kreuzreaktion zwischen den beiden Aldolase-Isoenzymen aus Spinat mit dem Immuntitrationstest mit Staphylococcus aureus im Schnitt bei 23 ± 16 ($n = 6$). Diese Versuche demonstrieren, daß die Tiere doch recht unterschiedlich auf die Antigene reagieren und sogar ein und dasselbe Tier seine Antikörperpopulationen gegen ein bestimmtes Antigen ändert (Jerne, 1971).

Wurden die beiden Aldolasen aus Spinat immunchemisch mit denen aus Erbsen, Mais, Portulaca oleracea, Dryopteris filix-mas und Mnium cuspidatum verglichen, so zeigten

alle diese Aldolasen im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony und im Immuntitrationstest mit Staphylococcus aureus eine ausgeprägte Kreuzreaktion, wenn das Antiserum gegen die Chloroplastenaldolase aus Spinat verwendet wurde. Mit diesem Serum reagierte die cytosolische Aldolase aus Spinat vergleichsweise nur sehr gering. Bei Verwendung des Antiserums gegen die cytosolische Aldolase gab es im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony neben der Selbstreaktion nur eine schwache Kreuzreaktion mit der Aldolase aus Portulaca oleracea; die übrigen Aldolasen reagierten nicht. Diese Versuche belegen, daß die Aldolasen aus Erbsen, Mais, Portulaca oleracea, Dryopteris filix-mas und Mnium cuspidatum dem Chloroplastenenzym aus Spinat strukturell viel ähnlicher sind als dem cytosolischen Enzym aus Spinat. Dies ist ein zweiter Befund, der darauf hindeutet, daß es sich bei diesen Aldolasen um Chloroplastenenzyme handeln muß. Es sei betont, daß die Aldolasen aus diesen Pflanzen aus technischen Gründen nicht zuerst in cytosolische und Chloroplastenenzyme getrennt werden konnten, so daß ihre Zellkompartimentierung unklar war. In Analogie zu der Situation in Spinatblättern ist es aber einleuchtend, wenn die isolierten Aldolasen aus den anderen Pflanzen auch Chloroplastenenzyme sind und dort ebenso wie in Spinatblättern ca. 90 % der Gesamtaldo-laseaktivität ausmachen. Unterstützt wird dieser Schluß noch durch einen dritten Befund, daß nämlich eine leichte Kreuzreaktion der Aldolase aus Portulaca oleracea mit der cytosolischen Aldolase aus Spinat bei Verwendung des Antiserums gegen die cytosolische Aldolase beobachtet

werden konnte. Die Präparation des Enzyms aus Portulaca oleracea war nicht ganz homogen, sondern zeigte noch nach Elektrophorese im Polyacrylamid-Gel eine Bande in Höhe der cytosolischen Aldolase aus Spinat, die sehr wahrscheinlich von dem cytosolischen Enzym stammt.

Die quantitative Auswertung der Kreuzreaktion zwischen der Chloroplastenaldolase aus Spinat mit den Aldolasen aus den anderen Pflanzen bei Verwendung des Antiserums gegen die Chloroplastenaldolase aus Spinat ergab ferner zwar kleinere, aber immerhin signifikante Unterschiede bei den einzelnen Enzymen. Am gravierendsten ist sicher der Befund zu bewerten, daß die Aldolase aus Mais und Portulaca oleracea nur zu 25 % bzw. 33 % kreuzreagierte, während das Moos- und Farnenzym stärker kreuzreagierten. Offensichtlich liegt in diesem Sinne keine Korrelation zu verwandtschaftlichen Beziehungen unter diesen Pflanzen vor. Für die Interpretation dieser Ergebnisse müssen jedoch auch Fehlermöglichkeiten berücksichtigt werden, die gerade in der Immunchemie zur Vorsicht bei Interpretation von Daten zwingen. Folgende Fehlerquellen sind zu erwägen. Beim genannten Immuntitrationstest mit Staphylococcus aureus beruhen alle Titerwerte u.a. auf der Menge des eingesetzten Antigens. Dies wurde im vorliegenden Fall durch Verwendung vergleichbarer Mengen an Enzymaktivität in dem Immuntitrationstest erreicht. Die spezifischen Aktivitäten der Aldolasen aus verschiedenen Pflanzen sind jedoch innerhalb eines Faktors 4 voneinander verschieden, obwohl alle Proteine homogen oder nahezu homogen waren. Dies kann u.a. an unterschiedlichen

Mengen inaktiven Aldolase-Proteins in den Präparationen liegen. Für die Chloroplastenaldolase aus Spinat wurde überprüft, daß das Enzym, das durch Inkubation bei 60°C inaktiviert wurde, nicht bei dem Immuntitrationstest interferiert. Gälte dies auch für die übrigen Enzyme, bedürften die Ergebnisse dieser Tests keiner Korrektur, sondern müßten als solche auch auf biologische Relevanz diskutiert werden. Im anderen Fall müßten die Werte der Kreuzreaktion auf der Basis vergleichbarer Proteinmengen errechnet werden. Ähnliche Erwägungen sind zu machen, wenn die gereinigten Aldolase-Proteine per se unterschiedliche spezifische Aktivitäten besitzen. Dieser Fall ist aber aufgrund der inzwischen bekannten Informationen über Aldolasen äußerst unwahrscheinlich und soll hier nicht weiter verfolgt werden.

Sollte nun tatsächlich eine dieser Fehlerquellen eine Korrektur der Werte für die Kreuzreaktion nötig machen, so würde sie vermutlich eher in Richtung höherer Homologie zur Chloroplastenaldolase aus Spinat hinauslaufen. Die geringe Kreuzreaktion der Chloroplastenaldolase mit der cytosolischen Aldolase (5 % bei dem verwendeten Antiserum) würde dadurch allerdings nicht erheblich berührt werden, da die cytosolische Aldolase nahezu die gleiche spezifische Aktivität wie die Chloroplastenaldolase aus Spinat hat und dies sicher kein Artefakt ist.

Immunchemische Vergleiche von Isoenzymen des Zuckerphosphat-Stoffwechsels wurden bereits mit einigen anderen Isoenzympaaren durchgeführt, nämlich mit der Glucose-

phosphat Isomerase aus Spinat (Herbert und Schnarrenberger, 1982; Weeden, 1982) und der Glycerinaldehyd-phosphat Dehydrogenase aus höheren Pflanzen (McGowan und Gibbs, 1974; Cerff und Chambers, 1979). Diese Isoenzyme zeigten praktisch keine Kreuzreaktion miteinander, was wie bei den Aldolase-Isoenzymen aus Spinat auf große strukturelle Unterschiede zwischen den Isoenzymen hindeutet. In dieselbe Richtung gehen auch immunchemische Untersuchungen der Malat Dehydrogenase aus Microbodies, Mitochondrien und dem Cytosol von Gurkenkeimlingen (Walk und Hoch, 1978). Alle diese Befunde belegen zunehmend, daß generell alle Kompartiment-spezifischen Isoenzyme große immunchemische und damit strukturelle Unterschiede aufweisen. Isoenzyme, die z.B. durch Mutationen eines Gens entstanden sind und die auch nur in einem Zellkompartiment vorkommen, scheinen diesem Prinzip nicht zu folgen und sich immunchemisch kaum zu unterscheiden (Cerff und Chambers, 1979; Gottlieb, 1982).

Mit Hilfe dieser immunchemischen Methoden lassen sich nur Differenzen oder Ähnlichkeiten an der Oberfläche der Proteine klären (Zakin et al., 1980). Um weitere Information über Unterschiede oder Homologien in der Struktur der beiden Aldolase-Isoenzyme aus Spinat zu erhalten, wurden die beiden Aldolasen bezüglich ihrer Aminosäurezusammensetzung und ihrer Peptidkarten nach tryptischer Spaltung miteinander verglichen. Bei der Aminosäurezusammensetzung zeigten sich Unterschiede in der Anzahl von Asparaginsäure, Threonin, Serin Glutaminsäure, Prolin, Valin, Methionin Tyrosin, Lysin und Arginin. Anderson

(1979) konnte nur sehr geringe Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der Aldolase-Isoenzyme aus Erbsen nachweisen. Die Chloroplastenaldolase enthielt dort 7 Asparaginsäuren pro Untereinheit mehr als die cytosolische. Diese beiden Enzyme von Erbsen besitzen jedoch identische relative Molekülmassen. Eine Aussage über das Ausmaß der Differenzen bzw. Homologien zwischen den beiden Proteinen läßt sich aber aus der Aminosäurezusammensetzung nicht oder nur sehr begrenzt machen. Einmal besteht keine ursächliche Korrelation zwischen Aminosäurezusammensetzung und Aminosäuresequenz und zum anderen besitzen die beiden Isoenzyme der Aldolase aus Spinat unterschiedliche relative Molekülmassen, und sie können schon dadurch eine unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung haben.

Die Peptidkartierung nach tryptischer Spaltung ermöglicht dagegen viel genauere Aussagen über Unterschiede bzw. Homologien zwischen den beiden Proteinen als die Aminosäurezusammensetzung. Im Fall der Spinataldolase wurden die nach Trypsinbehandlung erhaltenen Peptide durch Elektrophorese und Chromatographie zweidimensional getrennt. Bei den Peptidkarten der Aldolase-Isoenzyme sind besonders 2 negativ geladene Peptide der cytosolischen Aldolase augenscheinlich, die bei dem Chloroplastenprotein nicht vorhanden waren. Von den übrigen Peptiden des einen Proteins läßt sich kaum ein Peptid eindeutig einem Peptid des anderen Proteins zuordnen. Es scheinen deshalb gravie-

rende Unterschiede zwischen den beiden Aldolase-Isoenzymen zu bestehen. Nimmt man bei einer quantitativen Abschätzung an, daß kein einziges Peptid des einen Proteins mit einem des anderen Proteins übereinstimmt, ergibt dies einen Unterschied von mindestens 35 Aminosäuren, da aufgrund der Aminosäurezusammensetzung und einer relativen Molekülmasse der Untereinheiten von 38 000 für die cytosolische und 35 000 für die Chloroplastenaldolase ca. 35 Peptide pro Enzym-Untereinheit nach der tryptischen Spaltung zu erwarten sind. Bei 350 bis 380 Aminosäuren pro Aldolase-Untereinheit muß also statistisch mindestens jede 10. Aminosäure ausgetauscht sein. Dies ist eine Minimalabschätzung. Der tatsächliche Unterschied ist sicher erheblich größer. Immerhin wurden in der vorliegenden Analyse der Spinataldolasen 23 bis 27 verschiedene Peptide identifiziert, so daß die gerade aufgezeigte Modellbetrachtung den Unterschieden der beiden Spinataldolasen möglicherweise recht nahe kommt. Endgültige Aussagen über den Grad der Homologie zwischen den beiden Proteinen können jedoch erst nach Sequenzierung der Isoenzyme gemacht werden, zumal nicht ausgeschlossen werden kann, daß doch einige Peptide auf den beiden Peptidkarten miteinander übereinstimmen.

Cerff und Chambers (1979) haben ebenfalls große Unterschiede bei der Peptidkartierung zwischen den beiden Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenasen aus Chloroplasten einerseits und dem cytosolischen Enzym andererseits von Senf und Gerste nachweisen können. Sie hatten darüber hinaus festgestellt, daß sich die beiden Chloro-

plastenenzyme sowohl immunchemisch als auch bei der Peptidkartierung kaum unterscheiden. Auch dies bestätigt den generellen Befund, daß Kompartiment-spezifische Isoenzyme in ihrer Primärstruktur sehr unterschiedlich sind, während Isoenzyme, die in ein und demselben Kompartiment vorkommen, dagegen eher geringe Unterschiede aufweisen.

Zum Ende der Diskussion sei noch einmal auf die Evolution der beiden Aldolasen und ihre Erklärung durch die Genduplikationstheorie oder die Endosymbiontentheorie eingegangen. Wenn die Gene der Aldolase-Isoenzyme gemäß der in der Einleitung ausführlich beschriebenen Genduplikationstheorie entstanden wären, hätten sich die Isoenzyme im Lauf der Evolution so stark in ihren Eigenschaften und Strukturen geändert, daß die ursprüngliche Ähnlichkeit in den rezenten Pflanzen kaum noch sichtbar ist. Und zwar hätte auch innerhalb der Cytosol- und Chloroplastenaldolasen eine ähnlich große Variabilität auftreten müssen. Dies ist aber nicht beobachtbar. Damit führen meine immunchemischen Befunde zu einem nicht lösbaren Widerspruch zu dieser Theorie, und sie kann nicht, zumindest nicht ohne weitreichende Zusatzannahmen, zur Erklärung der Evolution der beiden Aldolasen herangezogen werden.

Nach der Endosymbiontentheorie sind die Gene, die für die Plastidproteine codieren, Gene der Symbiontenzelle, d.h. prokaryontischen Ursprungs, und die Gene der cytosolischen Proteine stammen von einer hypothetischen Eukaryontenzelle. In diesem Fall müßten die Gene, die für die Chloroplastenproteine codieren, größere Ähnlichkeiten mit den homologen pro-

karyontischen Genen zeigen als mit den entsprechenden Genen für die cytosolischen Enzyme , da die Aufspaltung zwischen Eukaryonten und Prokaryonten vor der Bildung der Pflanzen durch Verschmelzen vom photosynthetischen Prokaryonten mit einem Eukaryonten erfolgt sein muß. Vor allem muß man aber auch erwarten, daß die Zellkompartiment-spezifischen Isoenzyme erheblich größere Unterschiede aufweisen als je die Chloroplasten-Isoenzyme unter sich und die Cytosol-Isoenzyme unter sich, selbst aus phylogenetisch wenig nahestehenden Arten. Dies trifft nun fast uneingeschränkt für die Aldolase-Isoenzyme zu, denn die immunchemischen Befunde und die Peptidkartierung nach Trypsinspaltung im Rahmen meiner Arbeit zeigen eindeutig große strukturelle Unterschiede zwischen der cytosolischen und Chloroplastenaldolase aus Spinat, während die Chloroplastenaldolasen aus Spinat, Erbsen, Mais, Portulaca oleracea und selbst aus Farnen und Moosen erheblich geringere immunchemische Unterschiede unter sich aufweisen. Damit ist die Endosymbiontentheorie uneingeschränkt auf die Zellkompartiment-spezifischen Aldolase-Isoenzyme anwendbar und der Genduplikationstheorie vorzuziehen.

Evidenz für eine Evolution der Gene für Zellkompartiment-spezifische Isoenzyme im Sinne der Endosymbiontentheorie kann auch aus Befunden mit anderen Isoenzymen abgeleitet werden. Die Plastid-spezifischen Isoenzyme der Glycerinaldehyd-phosphat Dehydrogenase (Cerff und Quail, 1974), der Malat-Dehydrogenase (Ting und Rocha, 1971) und der Glutamat-Dehydrogenase (Leech und Kirk, 1968; Lea und

Thurman, 1972) bevorzugen ähnlich wie die Enzyme aus Cyanobakterien NADP, während die cytosolischen Isoenzyme aus Pflanzen NAD-spezifisch sind. Cyanobakterien und Plastiden enthalten ADP-Glucose-abhängige Pyrophosphorylasen, die cytosolischen Enzyme benutzen UDP-Glucose als Substrat (Mares et al., 1978). Die Fructose-1,6-bisphosphatase aus den Chloroplasten hat wie das Enzym aus Synechococcus, einer Cyanobakterie, ein pH-Optimum im alkalischen Bereich (Smillie, 1960; Udvardy et al., 1982), während die cytosolischen Enzyme ein pH-Optimum bei pH 7 besitzen (Scala et al., 1968). Die Glucosephosphat-Isomerase aus Spinatchloroplasten ist strukturell dem entsprechenden Enzym aus Synechococcus ähnlicher als dem cytosolischen Isoenzym aus Spinat, was durch Kreuzreaktion mit Antiseren gegen das cytosolische Enzym aus Spinat gezeigt wurde (Weeden, 1982). Die Glycerinaldehyd-phosphat-Dehydrogenasen aus dem Cytosol und den Chloroplasten von Senf zeigen nach immunchemischen Analysen und Vergleich der Peptidkarten große strukturelle Unterschiede (Cerff und Chambers, 1979). Diese Ergebnisse, die die katalytischen Eigenschaften und/oder auch die Strukturen der Enzyme aus dem Cytosol von Pflanzen einerseits und den Chloroplasten und Cyanobakterien andererseits beschreiben, demonstrieren eine starke Ähnlichkeit der plastidären Enzyme mit den prokaryontischen und eine erheblich geringere Ähnlichkeit mit den cytosolischen Isoenzymen. Diese Tatsachen stehen also im Einklang mit der Endosymbiontentheorie.

Die Befunde, daß die meisten Gene, die für Plastidenenzyme codieren, darunter auch die Gene für die Chloroplastenaldolase (Anderson und Levin, 1970; Gottlieb, 1973; Gottlieb und Weeden, 1979; 1980b; Tanksley und Rick, 1980), auf der Kern-DNA liegen, scheinen der Endosymbiontentheorie zu widersprechen. Es gibt jedoch Anhaltspunkte dafür, daß Gene aus Organellen im Lauf der Evolution in den Zellkern gelangt sind und dort integriert wurden: Die Phospholipid-Untereinheiten der ATPasen aus Saccharomyces cerevisiae und Neurospora crassa, die einander sehr homolog sind, werden bei Saccharomyces cerevisiae von der Mitochondrien-DNA und bei Neurospora crassa von der Kern-DNA codiert, der übrige Teil der ATPase in beiden Organismen von der Kern-DNA (Macino und Tzagoloff, 1979; Hensgens et al., 1979; Sebald et al., 1977). Ein weiteres Beispiel ist die Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase, deren große Untereinheit bei praktisch allen untersuchten Pflanzen vom Chloroplastengenom (Hartley et al., 1975; Sagher et al., 1976) und deren kleine Untereinheit vom Kerngenom codiert wird (Dobberstein et al., 1977; Cashmore et al., 1978), während bei der Alge Cyanophora paradoxa sowohl die kleine als auch die große Untereinheit in den Chloroplasten bzw. Cyanellen codiert werden (Hienhorst und Shively, 1983). Diese beiden Beispiele demonstrieren, daß Gene im Laufe der Evolution tatsächlich vom Organellengenom in das Kerngenom gewandert sein können. Ein solcher Gentransport für Isoenzyme vom Chloroplast in den Kern wurde von Margulis (1976) vorgeschlagen und ist aufgrund der beiden gerade dargelegten Befunde gar nicht so unwahrscheinlich.

Ein entscheidendes Merkmal in der Evolution der Aldolase kann in der Art ihres Reaktionsmechanismus gesehen werden, wonach man Aldolasen in Klasse I- und Klasse II-Aldolasen einteilt. Aldolasen höherer Pflanzen und Tiere sind Klasse I, Aldolasen aus Cyanobakterien sind Klasse II (Willard und Gibbs, 1968). Danach scheint die Chloroplastenaldolase nicht prokaryontischen Ursprungs zu sein, da sie ein Klasse I-Enzym ist und nicht wie die der Cyanobakterien ein Klasse II-Enzym (Brooks und Criddle, 1966; Jacobi, 1967). Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß eine Evolution der Aldolase bei höheren Pflanzen von einem Klasse II-Enzym in Richtung eines Klasse I-Enzyms erfolgte. Dies könnten möglicherweise die Aldolasen aus Euglena gracilis und Chlamydomonas reinhardtii belegen. In Euglena gracilis ist die Chloroplastenaldolase ein Klasse I-Enzym, die cytosolische ist ein Klasse II-Enzym (Mo et al., 1973), während bei Chlamydomonas reinhardtii die Klasse I- und II-Aldolasen beide im Cytosol lokalisiert sein sollen (Guerrini et al., 1971). Die Anwesenheit der Klasse I- und II-Aldolase-Isoenzyme bei den beiden Algen ist zwar abhängig von den Wachstumsbedingungen (Russell und Gibbs, 1966; Guerini et al., 1971; Mo et al., 1973), es wird jedoch deutlich, daß Klasse II-Aldolasen nicht auf Prokaryonten beschränkt sind. Umgekehrt enthalten auch viele Bakterien Klasse I-Aldolasen (Götz et al., 1980; Lebherz und Rutter, 1973; Stribling und Perham, 1973; London, 1974; Jayanthi Bay et al., 1975), wobei auch bei diesen die Ausbildung dieses Enzyms oft von den

Wachstumsbedingungen abhängt. Aus diesen Gründen kann das Fehlen von Klasse II-Aldolasen in den Plastiden nicht als alleiniges Kriterium gegen die Endosymbiontentheorie vorgebracht werden.

Wenn in dieser Arbeit eindeutige Hinweise über strukturelle Unterschiede zwischen der cytosolischen und Chloroplastenaldolase beschrieben werden, so bleibt dennoch die Frage, wie groß das Ausmaß der Unterschiede auf molekularer Ebene ist, d.h. in der Aminosäuresequenz der beiden Isoenzyme, und wie sich diese Differenzen im Laufe der Evolution entwickelt haben. Hierzu ist in jedem Fall die Information über die Primärsequenz der Isoenzyme erforderlich. Diese läßt sich durch die zeitlich und methodisch recht aufwendige Aminosäuresequenzierung der gereinigten Proteine oder neuerdings auch molekularbiologisch durch die erheblich elegantere Nucleotidsequenzierung von clonierter cDNA (complementäre DNA) bestimmen. Das weitere Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die günstigsten Bedingungen zu finden, unter denen möglichst viel Isoenzym-spezifische mRNA gebildet werden. Das ist Voraussetzung, um Isoenzym-spezifische cDNA clonieren zu können (Taylor, 1979).

Das Vorkommen von Aldolaseaktivität in Spinatblättern ist als die Expression der betreffenden Gene zu verstehen, die für die Aldolase codieren. Bei zwei Isoenzymen ist zudem die Expression zweier Gene zu erwarten. Daß mindestens 2 Gen-Loci für die Aldolase in Pflanzen codieren, ist durch genetische Versuche mit Erbsen dokumen-

tiert (Weeden und Gottlieb, 1980b). Die Expression dieser Gene ist in belichteten Blättern von Spinat offenbar so koordiniert, daß die cytosolische Aldolase ca. 8 % und die Chloroplastenaldolase ca. 92 % repräsentiert. Die Aktivität ist in den Chloroplasten ausreichend für ihre Funktion im Calvin-Zyklus, in der Glykolyse, in der Gluconeogenese und im oxidativen Pentosephosphatzyklus. Im Cytosol ist eine niedrigere Aktivität für die Funktion in der Glykolyse, in der Gluconeogenese und in dem Pentosephosphatzyklus ausreichend, ohne damit weiteres über metabolische Raten des Stoffwechsels implizieren zu wollen.

Um die Genregulation von Enzymen zu untersuchen, hat sich die Keimung von Samen als am besten geeignet erwiesen, da hierbei aufgrund entwicklungsbedingter Veränderungen von einem Zustand latent ruhenden Stoffwechsels über einen Zustand heterotrophen Stoffwechsels zu einem Zustand autotrophen Stoffwechsels extreme Änderungen der Genexpression von Enzymen und in sehr vielfacher Weise auftreten. Für die meisten der bisher untersuchten Enzyme hat sich dabei eine starke Aktivitätszunahme im Laufe der Keimung ergeben, die oft bereits bei Keimung im Dunkeln erfolgte oder/und durch Belichtung induziert/gesteigert wurde. Untersuchungen an Primärblättern von Phaseolus vulgaris zeigten außerdem, daß die Entwicklung vieler Enzyme, u.a. auch die der Aldolase, phytochromgesteuert ist (Bradbeer, 1971). Bei der Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß es sich bei einer solchen Aktivitätszunahme

während der Keimung um eine mRNA-abhängige de novo Synthese handelte (Cerff und Kloppstech, 1982). Daß Isoenzyme unterschiedlich stark in ihren Aktivitäten während der Keimung zunehmen, demonstrieren die Ergebnisse der Versuche an Radieschenkeimlingen von Schnarrenberger et al. (1975). Die Aktivität der Chloroplastenenzyme der 6-Phosphogluconat Dehydrogenase und der Glucose-6-phosphat Isomerase stiegen in belichteten Keimlingen relativ stärker an als die der cytosolischen Isoenzyme. Unbelichtete Cotyledonen hatten das gleiche Verhältnis dieser Isoenzyme. Dies steht im Gegensatz zur Aldolase aus Mais (Gasperini und Pupillo, 1982) und Spinat, bei denen in unbelichteten Cotyledonen die cytosolische Aldolase mit 25 % bis 50 % relativ stärker vertreten war als in belichteten Cotyledonen.

Samen aus Spinat scheinen nur eine Aldolase zu enthalten. Dies wurde auch von Takeo (1969) für Samen von Spinat, Radieschen und Karotten durch Elektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen gezeigt. Daß es sich um eine cytosolische Aldolase handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mit Sicherheit ermittelt werden, weil sie zwar bei derselben KCl-Konzentration wie die cytosolische Aldolase aus Spinat bei der Ionenaustauschchromatographie eluierte, aber nur sehr schwach mit dieser kreuzreagierte.

Die in dieser Arbeit gezeigten Befunde belegen, daß in Spinatkeimlingen bedeutende Änderungen in der Aldolaseaktivität insgesamt als auch im relativen Anteil für die beiden Isoenzyme auftreten. Da im ausdifferenzierten Blatt die Aldolaseakti-

vität im allgemeinen konstant ist, kann man nicht ausschließen, daß in diesem keine oder nur geringe Mengen mRNA vorliegen, wenn für die Aldolasen nur ein geringes Turnover stattfindet und/oder eine langlebige mRNA existiert. Damit kann auch eine erfolgreiche Clonierung von cDNA in Frage gestellt werden. Dieses Problem kann auf jeden Fall vermieden werden, wenn statt ausdifferenzierter Blätter junge wachsende Blätter verwendet werden, da man nach der Analyse dieser Arbeit in jedem Fall postulieren muß, daß im Zuge der Blattentwicklung, etwa von Primär- und Sekundärblättern, beide Aldolasen de novo synthetisiert werden müssen und die mRNA für beide Aldolasen in ausreichender Menge vorhanden sein muß. Cotyledonen zeigen sowohl im Dunkeln wie bei Belichtung starke Aktivitätszunahmen in den ersten Tagen der Samenkeimung. Eine Isoenzym-spezifische Translation der beiden Aldolasen ist dabei vor allem für die Chloroplastenaldolase bei Belichtung der Cotyledonen zu erwarten, während für die cytosolische Aldolase eine relativ verstärkte Translation im Dunkeln erfolgen dürfte. Damit dürften durchaus praktikable Bedingungen bei Spinatkeimlingen vorliegen, um ausreichend mRNA zu einer erfolgreichen cDNA-Clonierung und -Sequenzierung der beiden Isoenzyme vorzufinden. Denn da die beiden Aldolasen an mehreren Stoffwechselwegen beteiligt sind und aktiv sein müssen, ist eine ausschließliche Translation des einen oder anderen Isoenzyms in der Ontogenie einer Pflanze wohl nie verifiziert.

Mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen sind die Voraussetzungen für die weiteren Untersuchungen der

der Aldolase-Isoenzyme auf molekularbiologischer Ebene geschaffen. Erst diese Untersuchungen können eindeutig den Grad der Homologie zwischen den Aldolase-Isoenzymen und auch zwischen den Aldolasen aus verschiedenen Organismen klären.

5. Zusammenfassung

In Spinatblättern existieren 2 Isoenzyme der Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase, die durch Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose getrennt werden konnten. Das eine Isoenzym ist im Cytosol und das andere in den Chloroplasten der Zelle lokalisiert. Der Anteil der cytosolischen Aldolase an der Gesamtaktivität beträgt ca. 8 %, der der Chloroplastenaldolase ca. 92 % in belichteten Cotyledonen, Primär-, Sekundär- und Folgeblättern; in etiolierten Cotyledonen betragen die Anteile 25 % bzw. 75 %. Spinatsamen scheinen vorwiegend nur eine cytosolische Aldolase zu enthalten.

Eine Affinitäts-Chromatographie der getrennten Aldolase-Isoenzyme an Cellulosephosphat führte zu homogenen Proteinen nach den Kriterien der SDS-Gelelektrophorese. Die spezifischen Aktivitäten der cytosolischen und der Chloroplastenaldolase betrugen 7,2 und 7,8 units $\cdot$ (mg Protein)⁻¹.

Die K_m -Werte für Fructose-1,6-bisphosphat betrugen 2,4 μ M für die cytosolische und 10 μ M für die Chloroplastenaldolase, und die K_m -Werte für Glycerinaldehydphosphat betrugen 32 μ M bzw. 91 μ M. Beide Enzyme hatten identische pH-Optima im Bereich zwischen pH 7 und 9.

Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation und SDS-Gelelektrophorese ergaben, daß die Proteine aus 4 identischen Untereinheiten mit relativen Molekülmassen von 38 000 für die cytosolische und 35 000 für die Chloroplastenaldolase bestanden.

Mit Hilfe von Antikörpern aus Kaninchen und Meerschweinchen gegen die beiden Aldolase-Isoenzyme aus Spinat konnten im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony und in einem Immuntitrationstest mit Staphylococcus aureus nur geringe Kreuzreaktionen zwischen den Aldolasen festgestellt werden.

Eine Analyse der Aminosäurezusammensetzung ergab nur geringe Unterschiede zwischen den Aldolase-Isoenzymen aus Spinat. Die Peptidkartierung der Aldolasen nach tryptischer Spaltung zeigte jedoch große Differenzen.

Aldolasen aus Blättern von Erbsen, Mais, Portulaca oleracea, Dryopteris filix-mas und aus Mnium cuspidatum wurden ebenfalls bis zur Homogenität oder nahe zur Homogenität gereinigt. Die vorwiegende Aldolase in diesen Präparationen verhielt sich bezüglich ihrer katalytischen Eigenschaften, ihrer elektrophoretischen Mobilität bei der SDS-Gelelektrophorese und ihrer immunchemischen Kreuzreaktion homolog zum Chloroplastenenzym aus Spinat.

Die Ergebnisse demonstrieren große strukturelle Unterschiede zwischen den Zellkompartiment-spezifischen Isoenzymen der Aldolase aus Spinat und nur geringe zwischen den Chloroplastenaldolasen aus verschiedenen Pflanzen. Sie legen eine Evolution im Sinne der Endosymbiontentheorie, nicht aber im Sinne der Genduplikationstheorie, nahe.

6. Literaturverzeichnis

- Allsopp, A.: Phylogenetic relationship of the prokaryotes and the origin of the eukaryotic cell.
New Phytol. 68, 591-612 (1969)
- Anderson, L.E.: Chloroplast and cytoplasmic enzymes.
III. Pea leaf ribose 5-phosphate isomerases.
Biochim. Biophys. Acta 235, 245-249 (1971)
- Anderson, L.E.: Chloroplast and cytoplasmic enzymes.
VIII. Aminoacid composition of the pea leaf aldolases.
Plant Physiol. 64, 404-405 (1979)
- Anderson, L.E. and V.R. Advani: Chloroplast and cytoplasmic enzymes. Three distinct isoenzymes associated with the reductive pentose phosphate cycle.
Plant Physiol. 45, 583-585 (1970)
- Anderson, L.E., R.L. Heinrikson and C. Noyes: Chloroplast and cytoplasmic enzymes. Subunit structure of pea leaf aldolases.
Arch. Biochem. Biophys. 169, 262-268 (1975)
- Anderson, L.E. and D.A. Levin: Chloroplast aldolase is controlled by a nuclear gene.
Plant Physiol. 46, 819-820 (1970)
- Anderson, L.E., T.C.L. Ng and K.E.Y. Park: Inactivation of pea leaf chloroplastic and cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase by light and dithiothreitol.
Plant Physiol. 53, 835-839 (1974)
- Anderson, L.E. and I. Pacold: Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes. Pea leaf fructose 1,6-diphosphate aldolases.
Plant Physiol. 49, 393-397 (1972)
- Arnon, D.I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris.
Plant Physiol. 24, 1-15 (1949)

Beisenherz, G.: Triosephosphate isomerase from calf muscle.
In: Methods in Enzymology 1, 387-391 (1955)

Bradbeer, J.W.: Plastid development in primary leaves of
Phaseolus vulgaris.
J. exp. Bot. 22, 382-390 (1971)

Brooks, K. and R.S. Criddle: Enzymes of the carbon cycle
of photosynthesis. I. Isolation and properties of
spinach chloroplast aldolase.
Arch. Biochem. Biophys. 117, 650-659 (1966)

Cashore, A.R., M.K. Broadhurst and R.E. Gray: Cell-free
synthesis of leaf protein: Identification of an
apparent precursor of the small subunit of ribulose
1,5-bisphosphate carboxylase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 655-659 (1978)

Cerff, R.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP)
from Sinapis alba L.
Eur. J. Biochem. 82, 45-53 (1978)

Cerff, R. and S.E. Chambers: Subunit structure of higher
plant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases.
J. Biol. Chem. 254, 6094-6098 (1979)

Cerff, R. and K. Kloppstech: Structural diversity and
differential light control of mRNAs coding for angio-
sperm glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7624-7628 (1982)

Cerff, R. and P.H. Quail: Glyceraldehyde-3-phosphate
dehydrogenases and glyoxylate reductase.
Plant Physiol. 54, 100-104 (1974)

Cseke, C.S., N.F. Weeden, B.B. Buchanan and K. Uyeda: A spe-
cial fructose bisphosphate functions as a cytoplasmic
regulatory metabolite in green leaves.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4322-4326 (1982)

Czok, R.: D-Glycerat-3-Phosphat. In: Methoden der enzyna-
tischen Analyse. Vol. II (H.U. Bergmeyer, ed.),
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1389-1392 (1970)

- Dobberstein, B., G. Blobel and N.H. Chua: In vitro synthesis and processing of a putative precursor for the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of Chlamydomonas reinhardtii.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1082-1085 (1977)
- Fluri, R., T. Ramasarma and B.L. Horecker: Purification and properties of fructose diphosphate aldolase from spinach leaves.
Europ. J. Biochem. 1, 117-124 (1967)
- Garland, W.J. and D.T. Dennis: Plastid and cytosolic phosphofructokinases from the developing endosperm of Ricinus communis. I. Separation, purification, and initial characterization of the isoenzymes.
Arch. Biochem. Biophys. 204, 302-309 (1980)
- Gasparini, C. and P. Pupillo: Aldolase isoenzymes of maize leaves.
Plant Sci. Lett. 28, 163-171 (1982)
- Gottlieb, L.D.: Conservation and duplication of isoenzymes in plants.
Science 216, 373-380 (1982)
- Gottlieb, L.D.: Enzyme differentiation and phylogeny in Clarkia franciscana, C. rubicunda and C. amoena.
Evolution 27, 205-214 (1973)
- Gottlieb, L.D. and N.F. Weeden: Gene duplication and phylogeny in Clarkia.
Evolution 33, 1024-1039 (1979)
- Götz, F., S. Fischer and K.H. Schleifer: Purification and characterisation of an unusually heat-stable and acid/base-stable Class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase from Staphylococcus aureus.
Eur. J. Biochem. 108, 295-301 (1980)
- Guerrini, A.M., T. Cremora and E.C. Preddic: The aldolases of Chlamydomonas reinhardtii.
Arch. Biochem. Biophys. 146, 249-255 (1971)

- Hart, G.E.: Evidence for a triplicate set of glucose phosphate isomerase structural genes in hexyploid wheat.
Biochem. Genet. 17, 585-598 (1979)
- Hartley, M.R., A. Wheeler and R.J. Ellis: Protein synthesis in chloroplasts. V. Translation of messenger RNA for the large subunit of fraction I protein in a heterologous cell-free system.
J. Mol. Biol. 91, 67-77 (1975)
- Heber, U., N.G. Pon and M. Heber: Localization of carboxy-dismutase and triosephosphate dehydrogenases in chloroplasts.
Plant Physiol. 38, 355-360 (1963)
- Heil, J.A. and G. Lebherz: "Hybridization" between aldolase subunits derived from mammalian and plant origin.
J. Biol. Chem. 253, 6599-6605 (1978)
- Heinhorst, S. and J.M. Shively: The genes for the two subunits of ribulose-bisphosphate carboxylase in Cyano-phora paradoxa. In: Endocytobiology II, Intracellular Space as Oligogenetic Ecosystem (H.E.A. Schenk and W. Schwemmler, eds.), de Gruyter, 449-450 (1983)
- Heldt, H.W.: Metabolic carriers of chloroplasts. In: Encyclopedia of Plant Physiology (New Series). Vol. 3: Transport in Plants III (C.R. Stocking and U. Heber, eds.), Springer-Verlag Berlin, 137-143 (1976)
- Hensgens, L.A.M., L.A. Grivell, P. Borst and J.L. Bos: Nucleotide sequence of the mitochondrial structural gene for subunit 9 of yeast ATPase complex.
Proc. Nat. Acad. Sci. 76, 1663-1667 (1979)
- Herbert, M. and C. Schnarrenberger: Purification and subunit structure of glucosephosphate isomerase 2 from spinach leaves and immunochemical comparison with other isomerases.
Arch. Biochem. Biophys. 217, 452-459 (1982)

- Hurrell, J.G.R., K.R. Thulborn, W.J. Broughton, M.J. Dilworth, S.J. Leach: Leghaemoglobins: Immunochemistry and phylogenetic relationships.
FEBS Letters 84, 244-246 (1977)
- Jacobi, G.: Isolation und Eigenschaften von Aldolase aus isolierten Spinatchloroplasten.
Z. Pflanzenphysiol. 56, 262-272 (1967)
- Jayanthi Bay, N., M. Ramachandria Pai, P. Suryanarayana Murthy, T.A. Venkitasubramanian: Fructose diphosphate aldolase from Mycobacterium smegmatis. Functional similarities with rabbit muscle aldolase.
Arch. Biochem. Biophys. 168, 235-239 (1975)
- Jensen, R.G. and J.A. Bassham: Photosynthesis by isolated chloroplasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. 56, 1095-1101 (1966)
- Jerne, N.K.: Towards a network theory of the immune system.
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 125 C, 373 (1971)
- Kelly, G.J. and E. Latzko: Chloroplast phosphofructokinase. I. Proof of phosphofructokinase activity in chloroplasts.
Plant Physiol. 60, 290-294 (1977)
- Kessler, S.W.: Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A.
J. Immunol. 115, 1617-1624 (1975)
- Latzko, E. and M. Gibbs: Distribution and activity of enzymes of the reductive pentose phosphate cycle in spinach leaves and in chloroplasts isolated by different methods.
Z. Pflanzenphysiol. 59, 184-194 (1968)

- Latzko, E., G. Zimmermann and U. Feller: Evidence for a hexosediphosphatase from the cytoplasm of spinach leaves.
H-SZ Physiol. Chem. 355, 321-326 (19)
- Lea, P.J. and D.A. Thurman: Intracellular Location and properties of plant L-glutamate dehydrogenases.
J. exp. Bot. 23, 440-449 (1972)
- Lebherz, H.G. and W.J. Rutter: A Class I (Schiff base) fructose diphosphate aldolase of prokaryotic origin.
J. Biol. Chem. 248, 1650-1659 (1973)
- Leech, R.M. and P.R. Kirk: An NADP-dependent L-glutamate dehydrogenase from chloroplasts of Vicia faba L.
Biochem. biophys. Res. Commun. 32, 685-690 (1968)
- London, J.: Variations in the quaternary structure of three lactic acid bacteria aldolases.
J. Biol. Chem. 249, 7977-7983 (1974)
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
- Lück, H.: Catalase. In: Methods of Enzymatic Analysis (H.U. Bergmeyer, ed.), Academ. Press, New York, 885-894 (1965)
- Macino, G. and A. Tzagoloff: Assembly of the mitochondrial membrane system. The DNA sequence of a mitochondrial ATPase gene in Saccharomyces cerevisiae.
J. Biol. Che. 254, 4617-4623 (1979)
- Mares, D., J. Hawker and J. Possingham: Starch synthesising enzymes in chloroplasts of developing leaves of spinach (Spinacia oleracea L.).
J. exp. Bot. 29, 829-835 (1978)
- Margulis, L.: Origin of eukaryotic cells. In: Yale University Press, New Haven, London (1970)

- Margulis, L.: The genetic and evolutionary consequences of symbiosis.
Exp. Parasit. Rev. 39, 277-349 (1976)
- Martin, R.G. and B.N. Ames: A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: application to protein mixtures.
J. Biol. Chem. 236, 1372-1379 (1961)
- McGowan, R.E. and M. Gibbs: Comparative enzymology of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases from Pisum sativum.
Plant Physiol. 54, 312-319 (1974)
- Miernyk, J.A. and D.T. Dennis: Isoenzymes of the glycolytic enzymes in endosperm from developing castor oil seeds.
Plant Physiol. 69, 825-828 (1982)
- Mo, Y., G.G. Harris and R.W. Gracy: Triosephosphate isomerases and aldolases from light- and dark-grown Euglena gracilis.
Arch. Biochem. Biophys. 157, 580-587 (1973)
- Mühlbach, H. and C. Schnarrenberger: Properties and intracellular distribution of two phosphoglucomutases from spinach leaves.
Planta 141, 65-70 (1978)
- Murphy, D.J. and D.A. Walker: Aldolase from wheat leaves - its properties and subcellular distribution.
FEBS Letters 134, No.2, 163-166 (1981)
- Neville, D.M.: Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system.
J. Biol. Chem. 246, 6328-6334 (1971)
- Nishimura and Beevers: Isoenzymes of sugar phosphate metabolism in endosperm of germinating castor beans.
Plant Physiol. 67, 1255-1258 (1981)

Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels.

Arkiv Kemi Mineralogi Geologi 26 B (14), 1-9 (1949)

Parthier, B.: Zur Evolution von Chloroplasten und Mitochondrien.

Nova Acta Leopoldina NF 42, 223-239 (1975)

Prager, E.M. and A.C. Wilson: The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes. I. Microcomplement fixation studies.

J. Biol. Chem. 246, 5978-5989 (1971)

Racker, E.: Alcohol dehydrogenase from baker's yeast.

Methods Enzymol. 1, 500-503 (1955).

Russell, G.K. and M. Gibbs: Partial purification and characterization of two fructose diphosphate aldolases from Chlamydomonas mundana.

Biochim. Biophys. Acta 128, 145-154 (1966)

Sagher, D., H. Grosfeld, and M. Edelman: Large subunit ribulose biphosphate carboxylase messenger RNA from Euglena chloroplasts.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 722-726 (1976)

Scala, J., C. Patrick and G. MacBeth: FDPases of the castor bean endosperm and leaf: Properties and partial purification.

Arch. Biochem. Biophys. 127, 576-584 (1968)

Scandalios, J.G.: Isozymes in development and differentiation.

Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 225-258 (1974)

Schimper, A.W.F.: Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper.

Bot. Z. 41, 105-114 (1883)

Schnarrenberger, C. and H. Fock: Interactions among organelles involved in photorespiration. In: Transport in Plants III (C.R. Stocking and U. Heber, eds.), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 185-234 (1976)

- Schnarrenberger, C. and A. Oeser: Two isoenzymes of glucosephosphate isomerase from spinach leaves and their intracellular compartmentation.
Eur. J. Biochem. 45, 77-82 (1974)
- Schnarrenberger, C., A. Oeser and N.E. Tolbert: Two isozymes each of glucosephosphate 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves.
Arch. Biochem. Biophys. 154, 438-448 (1973)
- Schnarrenberger, C., M. Tetour and M. Herbert: Development and intracellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate cycle in radish cotyledons.
Plant Physiol. 56, 836-840 (1975)
- Schwartz and Dayhoff: Origin of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts.
Science 199, 395-403 (1978)
- Sebald, W., M. Sebald-Althaus and E. Wachter. In: "Mitochondria: Genetics and Biogenesis of Mitochondria" (W. Bandlow et al., eds.), de Gruyter, Berlin, 433-440 (1977)
- Simcox, P.D. and D.T. Dennis: Isoenzymes of the glycolytic and pentose phosphate pathways in proplastids from the developing endosperm of Ricinus communis L.
Plant Physiol. 61, 871-877 (1978)
- Smillie, R.: Alkaline C-1 fructose-1,6-diphosphatase: Evidence for its participation in photosynthesis.
Nature 187, 1024-1025 (1960)
- Stribling, D. and R.N. Perham: Purification and characterization of two fructose diphosphate aldolases from Escherichia coli (Crooke's strain).
Biochem. J. 131, 833-841 (1973)
- Takeo, K.: Aldolase Isozymes of higher plants.
Phytochem. 8, 2127-2131 (1969)

- Tanksley, S.D. and C.D. Rick: Isozymic gene linkage map of the tomato: Applications in genetics and breeding. Theoret. Appl. Genet. 57, 161-170 (1980)
- Taylor, J.M.: The isolation of eukaryotic messenger RNA. Ann. Rev. Biochem. 48, 681-717 (1979)
- Ting, I.P. and V. Rocha: NADP-specific malate dehydrogenase of green spinach leaf tissue. Arch. Biochem. Biophys. 147, 156-164 (1971)
- Tolbert, N.E., A. Oeser, R. Yamazaki, R.H. Hageman and T. Kisaki: A survey of plants for leaf peroxisomes. Plant Physiol. 44, 135-147 (1969)
- Torres, A.M., U. Diedenhofen, B.O. Bergh and R.J. Knight: Enzyme poly morphism as genetic markers in avocado. Am. J. Bot. 65, 134-139 (1978)
- Torres, A.M. and B. Tisserat: Leaf isoenzymes as genetic markers in date palms. Am. J. Bot. 67, 162-167 (1980)
- Udvardy, J., M. Godeh and G.L. Farkas: Regulatory properties of a fructose 1,6-diphosphatase from the cyanobacterium Anacystis nidulans. J. Bacteriol. 151, 203-208 (1982)
- Walk, R.A. and B. Hock: Cell-free synthesis of glyoxysomal malate dehydrogenase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 81, 636-643 (1978)
- Wallace, C.A. and D. Boulter: Immunological comparison of higher plant plastocyanins. Phytochem. 15, 137-142 (1976)
- Weeden, N.F.: Evolutionary affinities of plant phosphoglucose isomerase and fructose-1,6-bisphosphatase isozymes. In: Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research. Vol. 8: Cellular Localization, Metabolism, and Physiology (M.C. Rattazzi, J.G. Scandalios and G.S. Whitt, eds.), Alan R. Liss, Inc., New York, 53-66 (1982)

- Weeden, N.F. and L.D. Gottlieb: Isolation of cytoplasmic enzymes from pollen.
Plant Physiol. 66, 400-403 (1980a)
- Weeden, N.F. and L.D. Gottlieb: The genetics of chloroplast enzymes.
J. Hered. 71, 392-396 (1980b)
- Willard, J.M. and M. Gibbs: Purification and characterization of the fructose diphosphate aldolases from Anacystis nidulans and Saprospira thermalis.
Biochim. Biophys. Acta 151, 438-448 (1968)
- Wu, R. and E. Racker: Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism.
J. Biol. Chem. 234, 1029-1035 (1959)
- Yonuschot, G.R., B.J. Ortwerth and O.J. Koeppel: Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-requiring glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from spinach leaves.
J. Biol. Chem. 245, 4193-4198 (1970)
- Zakin, M.M., C. Hirth, J. Garel and G.N. Cohen: Detection of the homology among proteins by immunochemical cross-reactivity between denatured antigens. Application to the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases from different species.
Molec. Immunol. 17, 1373-1379 (1980)
- Zimmermann, G., G.J. Kelly and E. Latzko: Efficient purification and molecular properties of spinach chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase.
Eur. J. Biochem. 70, 361-367 (1976)
- Zimmermann, G., G.J. Kelly and E. Latzko: Purification and properties of spinach leaf cytoplasmic fructose-1,6-bisphosphatase.
J. Biol. Chem. 253, 5952-5956 (1978)

Die vorliegende Arbeit wurde im Fachbereich Biologie im Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Schnarrenberger durchgeführt vom 1.9.82 bis Januar 1984.

Ich bin Herrn Prof. Dr. C. Schnarrenberger für die Betreuung der Dissertation und die ständige Anteilnahme am Fortgang der Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. J. Salnikov und Herrn I. Amiri vom Institut für Biochemie und Molekularbiologie der TU Berlin danke ich für die Einweisung in die Techniken der Proteinchemie.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. R. Cerff vom Institut für Botanik der Universität Hannover für die Einarbeitung in die Technik der Gradienten-Gelelektrophorese.

Zuletzt danke ich den Gärtnern und Mitarbeitern der Werkstatt dieses Institutes für die Anzucht von Pflanzen und die Herstellung einiger Geräte.

Lebenslauf

1. Persönliches

Name	Krüger
Vorname	Ingo
Geburtstag	28.9.54
Vater	Dr. W. Krüger, Pflanzenpathologe
Mutter	Lieselotte Krüger, geb. Schütt, Hausfrau
Familienstand	verheiratet

2. Ausbildung

Grundschule	1960-1961	Hardenbergschule, Kiel
	1961-1966	President Pretorius Schule Potchefstroom, Südafrika
	1967	Deutsche Schule Pretoria, Südafrika
Gymnasium	1968	High School for Boys Potchefstroom, Südafrika
	1968-1973	Hebbelschule, Kiel
Abitur	1973	Hebbelschule, Kiel
Wehrdienst	1973-1974	Eckernförde, Flensburg, Kiel, (Marine)
Studium der Biologie	1974-1980	Christian-Albrecht- Universität Kiel
Diplom	1980	Christian-Albrecht- Universität Kiel
Angestellt als wiss. Mitarbeiter	1980-1981	Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin
Doktorand	1981-1984	Institut für Pflanzenphysi- ologie und Zellbiologie der FU Berlin bei Prof. Dr. C. Schnarrenberger

